Série A n° 3852
N° d'ordre :
4703

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR
LE GRADE DE
DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Luisa HIRSCHBEIN

1re THÈSE : RECHERCHES SUR LES HISTONES DU PLACENTA HUMAIN.

2me THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 21 Mars 1962, devant la Commission d'Examen.

Mlle LE BRETON Président
M. TONNELAT } Examinateurs
M. LEDERER }

1962

Série A n° 3852
N° d'ordre :
4703

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR
LE GRADE DE
DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Luisa HIRSCHBEIN

B. UNIV. BIBLIOTHÈQUE

1re THÈSE : RECHERCHES SUR LES HISTONES DU PLACENTA HUMAIN.

2me THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le Mars 1962, devant la Commission d'Examen.

Mlle LE BRETON Président
M. TONNELAT } Examinateurs
M. LEDERER }

1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE des SCIENCES de L'UNIVERSITE DE PARIS

- PROFESSEURS -

Doyen ..... M. ZAMANSKY

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure
DE BROGLIE	T	Théories physiques
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
CHAUDRON	T	Chimie appliquée
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale
FAVARD	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du Globe
M^lle COUSIN	T	Biologie animale (S.P.C.N.)
CHRETIEN	T	Chimie minérale
DRACH	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIERE	T	Géologie S.P.C.N. et sédimentaire
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.)
LUCAS R.	T	Recherches physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DANJON	T	Astronomie
PETIT	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.)
M^lle CAUCHOIS	T	Chimie Physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HERITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Pétrographie
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théories physiques
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et Cristallographie
J.-P. MATHIEU	T	Physique (Optique)
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
MAY	T	Zoologie (Orsay)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)
BRELOT	T	Calcul différentiel et intégral
NORMANT	T	Synthèse organique générale
BENARD	T	Chimie minérale
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T	Statistiques mathématiques
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végétale
MARECHAL	T	Optique théorique et appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
M^lle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition
SALEM	T	Mathématiques générales
LELONG	T	Applications de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées
EHRESMANN	T	Topologie Algébrique
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMAN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Paléontologie stratig.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.)
RIZET	T	Génétique (Orsay)
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
M^me TONNELAT	T	Physique théorique
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale
BRUSSET	T	Chimie systématique
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
M^me CHAIX	T	Chimie biologique
M^me HUREL-PY	T	Biologie végétale (P C.B.)
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.)
BRUN	T	Mécanique théorique des fluides
LEDERER	T	Chimie biologique
M^me DUBREIL	T	Mathématiques (Agrégation)
M^me LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.)
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)
COTE	T	Physique électricité
DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)
MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay)
OLMER	T	Energétique générale
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie Physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER		Physiologie comparée
CAMUS		Physiologie végétale (B.M.P.V.)
CASTAING	T	Physique (Orsay)
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie
MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay)
NOIROT		Evolutions des êtes organisés
PANNETIER	T	Chimie générale (Orsay)
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie théorique
TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.)
DODE	T	Chimie (Orsay)
FREYMANN	T	Recherches physiques
GUINOCHET	T	Biologie végétale (S.P.C.N.) (Orsay)
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.)
M^lle JOSIEN	T	Chimie (S.P.C.N.)
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)
CHAPELLE	T	Physique (Orsay)
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay)
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay)
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie Physique
BERTHELOT	T	Physique fondamentale des hautes énergies (Orsay)
BRICART	T	Météorologie et physique de l'atmosphère
M^me ALBE-FESSARD		Psychophysiologie
FRIEDEL		Physique des solides (Orsay)
M. JULIA		Etudes des moléculaires naturelles complexes
LENDER	T	Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay)
MAGAT		Physico-chimie des radio-éléments
M^lle QUINTIN	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physiologie animale (Orsay)
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie
LEMEE	T	Physiologie végétale (B.M.P.V.) (Orsay)
GUERIN	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay)
CHATELET M.		Chimie (P.C.B.)
JEAN	T	Physique nucléaire (Orsay)
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.) (Orsay)
MICHEL L.		Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
BERGERARD		Zoologie (Orsay)
BERTEIN		Electronique (Orsay)
BOUISSIERES		Chimie des radioéléments (Orsay)
M^me COUTURE		Thermodynamique et mécanique physique
ELLENBERGER		Géologie appliquée sur le terr.
FRANC		Biologie animale (P.C.B.)
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay)

STOLKOWSKI		Physiologie générale
ACHER		Chimie biologique (Orsay)
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T	Technique mathématique de la Physique
BAUDOIN		Biologie animale (P.C.B.)
BEAUMONT		Biologie animale (S.P.C.N.)
BLAMONT		Géophysique ionosphère
BOURREAU		Botanique
CURIE D.		Physique (M.G.P.)
DURAND-DELGA		Géologie
FREON	T	Chimie organique (Orsay)
HELLER		Physiologie végétale
TORTRAT		Calcul des probabilités
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.)
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.)
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
M^lle FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.)
M^me CHOQUET-BRUHAT	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste

M^lle VEIL		Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires
BROCHARD	T	Physique (P.C.B.) (Orsay)
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	Mathématiques (M.P.C.) (Orsay)
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay)
CAIRE		Géographie physique et Géologique dynami
COMOLET		Mécanique des fluides
CORABŒUF		Physiologie animale
DELLOUE		Physique de l'exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
HOUILLON		Biologie animale (P.C.B.)
JULLIEN J.		Chimie (P.C.B.)
MALGRANGE		Technologie mathéamtique de la Physiqu
OLIVIER		Antropologie
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE		Physique (E.N.S.) (Orsay)

Secrétaire général ..... R. POULLAIN

Cette thèse a été réalisée a l'Institut de Biologie Physico-Chimique dans le service de Mme Y.Khouvine, Directeur de Recherches au C.N.R.S.

J'exprime ici à Mme Khouvine ma très vive reconnaissance pour l'aide morale et matérielle qu'elle a constamment su me donner au cours de cette recherche.

J'adresse également mes remerciements à MM. Szafarz et Lambiote qui m'ont fourni par leurs discussions l'appui nécessaire à la rédaction de cette étude.

A M.J.P.Zalta mes remerciements pour les amicales suggestions qu'il m'a toujours prodiguées.

Je tiens d'autre part à remercier Mlle Rosa Rosenscwajg qui m'a offert sa collaboration de façon si désintéressée.

Il m'est également agréable de remercier M. et Mme de Mende pour l'aide qu'ils m'ont toujours apportée pour la réalisation et l'interprétation de l'électrophorèse, ainsi que la station d'ultracentrifugation du C.N.R.S.

Je remercie enfin l'ensemble des travailleurs de l'Institut de Biologie Physico-chimique qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

L'intérêt constant que le Professeur J.A.V.Butler F.R.S., a manifesté à l'égard de la présente thèse m'a été d'une aide précieuse. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus vive reconnaissance.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538119_0017

ABREVIATIONS UTILISEES

ATP	adénosine triphosphate
ARN	acide ribonucléique
ADN	acide désoxyribonucléique
DNP	désoxyribonucléoprotéide
DFP	diisopropylfluorophosphate
FDNB	fluorodinitrobenzène
CMC	carboxyméthylcellulose
Tris	tris-hydroxyméthylaminométhane

oooooooooooo

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION ..... page 7

TECHNIQUES ..... " 9

CHAPITRE I.

PREPARATION DES HISTONES DU PLACENTA HUMAIN " 14

A. Extraction de l'histone à partir des nucléoprotéides " 15

B. Extraction de l'histone à partir des noyaux isolés " 16

C. Fractionnement de l'histone totale " 18

1) Fractionnement par précipitation " 18

2) Méthode chromatographique " 20

CHAPITRE II.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES HISTONES DU PLACENTA HUMAIN " 24

A. Electrophorèse " 24

1) Etude électrophorétique de l'histone totale " 26

a) A différents pH " 26

b) Après deux dialyses successives à différents pH " 28

c) Action du diisopropylfluorophosphate " 31

2) Electrophorèse des fractions I et II " 34

3) Electrophorèse des fractions A et B " 35

4) Point isoélectrique de l'histone totale et des fractions A et B " 42

B. Ultracentrifugation " 48

CHAPITRE III.

COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HISTONE TOTALE DU PLACENTA HUMAIN ET DE SES FRACTIONS page 54

A. Composition en acides aminés " 54

1) de l'histone totale " 56

2) des fractions I et II " 58

3) des fractions A et B " 60

B. Groupes N-terminaux " 62

1) de l'histone totale " 63

2) des fractions I et II " 64

3) des fractions A et B " 64

C. Discussion " 65

D. Lipides " 68

1) Recherche qualitative " 70

2) Recherche quantitative " 70

3) Discussion " 71

E. Conclusions " 72

CHAPITRE IV

FONCTION METABOLIQUE DES HISTONES " 74

A. Introduction " 74

B. Méthodes d'isolement des noyaux de placenta " 80

C. Extraction de l'histone totale à partir des noyaux " 83

D. Incorporation des acides aminés marqués dans les noyaux " 84

1) Conditions de l'incorporation " 85

2) Incorporation des acides aminés marqués dans les protéines basiques " 89

3) Etude du composé dialysable extrait par HCl 0, 02 N " 93

E. Incorporation des acides aminés marqués dans les fragments de noyaux éclatés page 97

1) Obtention des fragments par action d'agents tensio-actifs " 98

2) Conditions de l'incorporation des acides aminés marqués " 102

3) Composition chimique des fragments " 103

4) Action de l'histone totale, des fractions A et B, de la protamine et de la polylysine sur l'incorporation des acides aminés marqués dans les fragments de noyaux " 103

5) Action de la désoxyribonucléase " 105

6) Action de la ribonucléase " 106

F. Conclusions " 106

CONLUSIONS GENERALES . . . . . " 109

BIBLIOGRAPHIE . . . . . " 111

oooooooo

INTRODUCTION

Depuis une dizaine d'années, l'étude cytochimique et biochimique du noyau cellulaire a permis d'élucider partiellement la fonction de ses différents constituants, en particulier des acides ribonucléique et désoxyribonucléique .

Mais le rôle des protéines basiques (histones) qui accompagnent l'ADN dans les désoxyribonucléoprotéides, reste encore l'objet d'hypothèses diverses qui ne sont que des variantes de deux hypothèses émises l'une par Caspersson en 1941, l'autre par Stedman en 1950. Caspersson pense que les histones sont synthétisées sous le contrôle de l'hétérochromatine, puis qu'elles s'accumulent dans le nucléole et de là migrent vers le cytoplasme où elles induiraient la synthèse d'ARN cytoplasmique. Stedman attribue aux histones une fonction de contrôle de la différentiation des cellules chez les organismes supérieurs par l'intermédiaire d'un blocage spécifique de certaines zones de l'ADN.

Tout dernièrement, la découverte de protéines basiques dans les ribosomes de foie de rat (Butler, 1960) et dans E. coli (T'so, 1958) met en doute la localisation exclusivement nucléaire de ces protéines et révèle un nouvel aspect des interrelations nucléo-cytoplasmiques qui pourrait éventuellement constituer un argument en faveur de l'idée de Caspersson sur la diffusion des histones hors du noyau.

On admet donc actuellement que les histones nucléaires existent sous forme de complexes hétérogènes. Parmi les tissus étudiés, seuls les tissus néoplasiques ont été trouvés porteurs d'histones particulières, qui semblent spécifiques, puisqu'on ne les a pas retrouvées par les méthodes chimiques et physico-chimiques utilisées,

dans les tissus normaux homologues.

Nous avons abordé l'étude d'une histone d'origine humaine, afin de mettre éventuellement en évidence, en la comparant aux histones d'origine animale déjà connues, une spécificité, soit de tissu, soit d'espèce. Un des tissus humains aisément accessible à l'expérimentation étant le placenta à terme, nous l'avons utilisé comme source d'une histone d'origine humaine dont nous avons fait l'étude chimique et physico-chimique.

D'autre part, on savait que les histones provenant des tissus normaux et des tissus cancéreux avaient une activité métabolique différente, cette activité étant exprimée par l'incorporation d'acides aminés marqués à l'aide d'un isotope radioactif. Poursuivant la comparaison de l'histone humaine avec les histones animales, nous avons étudié cet aspect de son activité métabolique et tenté d'en déduire des renseignements sur le rôle qu'elle pourrait jouer dans la physiologie nucléaire et notamment dans la synthèse des protéines du noyau.

Les deux questions que nous avons tenté de résoudre dans ce travail concernent donc : 1°) l'existence d'une spécificité des histones en général, des histones d'origine humaine en particulier; 2°) le rôle métabolique de ces histones.

oooooooo

TECHNIQUES

Dosage des protéines

L'incorporation d'un acide aminé dans une protéine est exprimé par la radioactivité spécifique de cette dernière, c'est-à-dire la radioactivité mesurée pour un échantillon donné, corrigé pour l'auto-absorption et ramenée à 1 mg de protéines. C'est pourquoi, nous avons procédé au dosage des protéines dont nous avons d'autre part déterminé la radioactivité.

Nous avons utilisé deux méthodes différentes, selon les qunatités de protéines à doser.

I. Dosage des protéines par la méthode de Folin (Lowry, 1951)

Par cette méthode on peut doser 15 à 150 µg de protéines

Réactifs :

Solution A -- CO_3Na_2 2% dans NaOH 0,1 N.

B -- SO_4Cu 6 H_2O 0,5 % dans tartrate de Na ou K 1%

A'-- CO_3Na_2 2%

C -- 50 ml A + 1 ml B

La solution C doit être préparée 1/2 heure avant l'emploi. Elle est stable une journée; si la solution à doser est très alcaline, préparer la solution D.

D -- 50 ml A' + 1 ml B.

Folin - solution E --

a) 100 g WO_4Na_2 + 25 g MoO_4Na_2 + 700 ml H_2O + 50 ml sol. PO_4H_3 à 80% + 100 ml HCl concentré;

b) chauffer doucement pendant 10 heures;

c) ajouter 150 g SO_4Li_2 et amener à 800 ml d'eau;

d) ajouter goutte à goutte Br (environ 5 gouttes) pour que la solution soit de couleur jaune clair;

e) réchauffer jusqu'à ce que l'excès de Br disparaisse, en contrôlant avec le papier à IK;

f) laisser refroidir et amener à 1 litre avec de l'eau distillée. Conserver en flacon brun 1/3 de cette solution + 2/3 d'eau. Si la couleur disparaît ajouter de nouveau Br et recommencer à partir de e).

Technique de dosage :

0,7 ml solution à doser (ou moins et compléter à 0,7 avec de l'eau). 3 ml de C ou D. Laisser 15 minutes à température ordinaire. Ajouter 0,3 ml de la solution E. Agiter immédiatement. Laisser reposer 30 minutes avant de faire la lecture à 650 mμ au spectrophotomètre de Jobin et Yvon. Les résultats sont exprimés en μg de protéines/ml.

II. Dosage des protéines par la méthode du biuret

Par cette méthode on peut doser de 400 à 2000 μg de protéines.

Réactif de biuret :

1,5 g SO_4Cu, 5 H_2O,

6 g tartrate double de Na et K, 4 H_2O

Dissoudre dans 500 ml H_2O. Ajouter en agitant constamment 300 ml NaOH à 10%; amener à 1 litre.

Solvant des protéines :

NaOH N, 10 ml

octylphénolpolyoxyéthyléné 2 ml

H_2O q.s.p. 30 ml

Dosage :

On fait une prise de 0, 1 ml (on amène à 0, 5 ml avec le solvant des protéines). On ajoute 2 ml du réactif du biuret. On agite et on attend 30 minutes. Les lectures sont faites à 540 mμ au spectrophotomètre Unicam.

Pour établir la courbe étalon, on titre le réactif du biuret avec une solution titrée de lactoglobuline.

Pour connaître la teneur en acides nucléiques et en lipides des noyaux entiers et de leurs fractions, nous avons dosé l'ARN l'ADN et les lipides totaux par les techniques suivantes :

Dosage d'ARN (Slater, 1958, modifié par Zalta)

Réactifs : Orcinol 10% dans éthanol 96°

Perchlorure de fer dans HCl fumant, 0, 1%

Mélange chloroforme/éther (9/1)

Procédé : x ml de solution à doser

+ (3 - x) ml d'H_2O

+ 3 ml de perchlorure ferrique

+ 0, 3 ml d'orcinol

Chauffer à 100°C pendant 45 minutes. Refroidir. Extraire avec 7 ml du mélange chloroforme-éther; laisser décanter 3 à 4 heures (la coloration est stable 24 heures au moins).

La couleur reste dans la phase aqueuse. Les lectures sont faites à 520 et 670 mμ dans le colorimètre Jouan. Pour connaître la quantité d'ARN dosé, on utilise la formule de Slater, modifiée par Szafarz, qui tient compte de la correction qu'il faut apporter pour le glucose :

$$\text{concentration d'ARN} = \frac{1,648\ E_{670} - E_{520}}{5,\ 56} \times 10^3\ \mu g \text{ dans le volume final de 6, 3 ml.}$$

Dosage d'ADN (Webb et Levy, 1955)

Extraction de l'ADN : Les noyaux sont mis en suspension dans 3 ml de TCA 5%. On chauffe 30 minutes au bain-marie bouillant (on utilise environ 20 mg de poudre sèche, contenant jusqu'à 150 µg d'ADN par ml de TCA 5%). Après refroidissement, on ajoute 3 ml de TCA 5% et on centrifuge.

Réactif : p-nitrophénylhydrazine à 0,5% dans l'alcool (à utiliser dans la journée). Solution stock d'ADN : 25 mg d'ADN sont mis en suspension dans 20 ml de TCA 5%; on chauffe 30 minutes au bain-marie bouillant, on complète à 25 ml. Pour les concentrations plus faibles, on dilue avec du TCA 5%.

Technique : 2 ml de solution d'ADN hydrolysé contenant 10 à 300 µg.

2 ml de TCA 5%

0,2 ml p-nitrophénylhydrazine. Le blanc se fait avec 4 ml de TCA 5%.

Chauffer 20 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, ajouter 10 ml d'acétate de n-butyle. Fermer les tubes avec un bouchon de caoutchouc et agiter 5 minutes. Centrifuger pour compléter la séparation de la phase organique et décanter la plus grande partie. Attendre 1 heure et décanter complètement.

3 ml de la phase aqueuse sont mis dans une fiole de 5 ml. On ajoute 1 ml de NaOH 2 N et on complète à 5 ml avec H_2O. Mélanger. Lire au colorimètre immédiatement, à 560 mµ (la couleur est stable pendant 5 minutes).

Dosage des lipides (Houget et Boutou, 1958)

Extraction des lipides totaux : On introduit la poudre à analyser dans un ballon à long col rodé, on ajoute 10 ml d'éthanol. On place le ballon surmonté d'un réfrigérant dans un bain d'eau à 80°,

et l'ébullition légère est poursuivie pendant 30 minutes. On refroidit, on précipite les protéines et on transvase le liquide dans un ballon de 100 ml.

Trois extractions sont faites ensuite à l'aide, chaque fois, de 10 ml d'éther purifié. On chauffe 15 minutes seulement et on transvase dans le ballon de 100 ml de la même manière qu'auparavant. On élimine l'éther par chauffage dans un bain-marie à 50° puis par de l'alcool et on amène à sec sous vide.

On reprend les lipides quatre fois par du benzène que l'on amène à l'ébullition et que l'on transvase dans une fiole jaugée de 10 ml.

Dosage des lipides

Réactifs utilisés :

Solution A -- chlorhydrate d'hydroxylamine à 7,5% dans l'éthanol à 95° purifié.

B -- NaOH à 7,5% dans l'éthanol à 95°.

C -- acide perchlorique, 2 ml d'acide à 65% dans 100 ml d'éthanol à 95°.

D -- perchlorate de fer : 1,60 g de perchlorure de fer sont dissous dans 7 ml de NaOH auxquels on ajoute 15 ml d'acide perchlorique à 65%. On chauffe jusqu'à vapeurs blanches abondantes. On étend après refroidissement à 100 ml avec de l'eau.

Mode opératoire : On prend 1 ml de la solution benzénique. On évapore. On introduit 0,2 ml d'éther. On ajoute 0,2 ml d'un mélange de la solution A + B. On chauffe 10 minutes les tubes à 40°. On refroidit et on ajoute 2,7 ml du mélange suivant :

-- 18 ml de la solution C,

-- 1,4 ml de la solution D,

-- 7,6 ml d'éthanol à 95°.

On fait la lecture après 20 minutes à 520 mμ.

°°°°°°°°

Première partie

ETUDE CHIMIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE DES HISTONES DU PLACENTA HUMAIN

Chapitre I

PREPARATION DES HISTONES DU PLACENTA HUMAIN

Les histones constituent un groupe de protéines basiques que l'on trouve toujours liées à l'ADN. Trouvées dans les noyaux de toutes les cellules somatiques étudiées jusqu'ici, elles ont été extraites de la plupart des tissus de mammifères ainsi que des érythrocytes d'oiseaux (Kossel, 1888), de poissons et de batraciens (Vendrely, 1957). Les bactéries n'en contiennent pas (Wilkins, 1959) et, dans le sperme de poisson, on a mis en évidence des protéines basiques plus simples, les protamines.

Une histone a été isolée pour la première fois en 1888 à partir d'érythrocytes d'oie, par Kossel qui, après avoir hémolysé les érythrocytes par l'eau, en a extrait le résidu insoluble par un acide dilué et précipité l'histone par l'ammoniaque.

En 1908, Nelson obtient à partir du thymus de veau une protéine riche en lysine qu'il appelle "thyamamine". En 1921, d'un extrait acide de ganglions lymphatiques et de thymus, Felix précipite par l'acide phospho-tungstique une protéine également riche en lysine.

Il faut attendre les années 1942-44 pour trouver mention d'histones extraites de nucléoprotéides séparés des noyaux isolés (Mirsky, 1942, Stedman, 1944); ces histones se caractérisent aussi par leur richesse en lysine. Pour la première fois, en 1950, une histone riche en arginine est extraite de l'adénocarcinome mammaire humain et de l'épitheliome T 8 de Guérin par Khouvine et coll. Ce n'est qu'à partir de 1951 que l'hétérogénéité des histones extraites est mise en évidence par des méthodes physico-chimiques et que l'on essaie d'obtenir des fractions homogènes (Stedman et Stedman, 1944).

Nous décrirons brièvement la préparation et le fractionnement des histones obtenues, soit à partir de nucléoprotéides, soit à partir des noyaux isolés.

A. EXTRACTION DE L'HISTONE A PARTIR DES NUCLEOPROTEIDES

1) Préparation des nucléoprotéides

Les désoxyribonucléoprotéides sont insolubles dans des solutions de NaCl diluées (Kawade, 1957). C'est cette propriété qui est à la base des deux procédés de préparation décrits ci-dessous. Le critère de pureté utilisé est le rapport N/P qui doit se situer entre 4 et 5.

Mirsky et coll. (1946) préparent les désoxyribonucléoprotéides du thymus de veau en diluant l'extrait salé concentré par de l'eau jusqu'à obtention d'une concentration 0, 2 M en NaCl. Par contre, Butler et coll. (1954) diluent davantage, jusqu'à la concentration de 0, 14 M.

2) Extraction de l'histone à partir des désoxyribonucléoprotéides.

Grégoire et Limozin (1954) dissolvent les désoxyribonucléoprotéides, obtenus selon la méthode de Mirsky, dans NaCl à 10 p.cent . L'acide nucléique est précipité par l'addition d'éthanol. L'histone reste en solution; après quelques heures à la glacière, une première fraction (fraction P) précipite, la fraction S reste en solution; l'histone P contient des quantités équimoléculaires d'arginine et de lysine, tandis que l'histone S est riche en lysine.

Davison et coll. (1954) extraient l'histone totale à partir des désoxyribonucléoprotéides par HCl 0, 2 N; de l'extrait ils précipitent, par NH_4OH, une histone riche en arginine et par l'acétone, une histone riche en lysine.

Smillie (1958) extrait l'histone totale avec HCl 0, 3 N et

obtient deux fractions, l'une soluble, l'autre précipitable par NaCl à saturation.

B. EXTRACTION DE L'HISTONE A PARTIR DES NOYAUX ISOLES

Daly et coll. (1955), Ui (1956) et Stedman (1958) extraient l'histone totale des noyaux par H_2SO_4 0,5 N et précipitent deux fractions, soit en utilisant deux concentrations d'éthanol (Ui et Stedman), soit par alcalinisation suivie d'une addition d'éthanol (Daly et Mirsky).

Tous ces procédés de préparation ont conduit à deux fractions d'histone, l'une riche en arginine, l'autre riche en lysine. Mais l'étude des fractions obtenues à partir d'un même tissu (analyses des acides aminés, électrophorèses et ultracentrifugations) montre que les diverses techniques conduisent à des produits différents. D'autre part, l'homogénéité de chacune de ces fractions est contestable.

Néanmoins, on peut dire que toutes les histones possèdent en commun les propriétés suivantes :

-- 1) insolubilité dans un excès d'alcali (Kossel et coll., 1900) ;
-- 2) richesse en acides aminés basiques (Kossel, 1928) ;
-- 3) solubilité dans H_2SO_4 0,34 M dans H_2SO_4 1,88 M (Mirsky et coll., 1946);
-- 4) point isoélectrique entre pH 10 et 11 (Mirsky et coll., 1946);
-- 5) teneur en azote de 18% environ (Daly et coll., 1955).

Nous avons voulu étudier l'histone du placenta humain et ses produits de fractionnement afin de comparer ses proriétés à celles d'histones de tissus normaux d'autres espèces animales. Les remarques que nous venons de formuler montrent que les produits obtenus diffèrent en grande partie suivant les techniques utilisées; du choix de celles-ci dépend donc la valeur de nos comparaisons.

Nous avons effectué l'étude chimique et physico-chimique de l'histone totale et de ses fractions sur l'histone extraite des désoxyribonucléoprotéides.

Nous exposerons successivement la préparation de ces désoxyribonucléoprotéides, l'extraction de leur histone et enfin le fractionnement de celle-ci.

1) Extraction des désoxyribonucléoprotéides à partir de placenta humain

Nous avons utilisé comme tissu de départ la partie foetale du placenta humain à terme. Le placenta est perfusé à 4°C avec une solution physiologique, puis il est débarrassé du chorion et du tissu maternel. Il est découpé en petits morceaux, lavé dans du saccharose 0,25 M et broyé au Waring Blendor pendant 2 minutes dans 2 fois son volume de NaF à 4 0/00. On centrifuge à froid pendant 10 minutes à 600 g. On rejette le surnageant et le culot est remis en suspension dans NaCl à 10% et agité mécaniquement pendant une nuit.

On centrifuge une heure à froid à 6.000 g. Le surnageant de cette dernière centrifugation est visqueux et contient les désoxyribonucléoprotéides solubles. Ceux-ci sont précipités sous forme de fibres blanches par dilution avec 6 fois leur volume d'eau distillée (c'est-à-dire à la concentration finale en NaCl de 0,9 %).

Les désoxyribonucléoprotéides sont purifiés par 3 dissolutions dans NaCl à 10%, dialysées successivement et re-précipitées dans une solution de NaCl à 0,9%. Le rapport N/P des désoxyribonucléoprotéides obtenus est égal à 4,6.

2) Extraction de l'histone totale à partir des désoxyribonucléoprotéides .

Nous avons choisi d'extraire l'histone totale par un acide, car son extraction par une solution neutre conduit à des substances dont les diagrammes électrophorétiques sont relativement plus complexes

et dont la conservation en milieu neutre provoque l'apparition de produits polymérisés (Davison et coll., 1954). Crampton (1957) a démontré que l'extraction de l'histone en milieu acide fournit une protéine qui n'est pas un artefact, mais que celle-ci préexiste bien dans le complexe nucléoprotéique.

On extrait l'histone totale à partir des désoxyribonucléoprotéides en ajoutant aux DNP 3 fois leur volume de HCl 0,2 N. On agite pendant 16 heures. On centrifuge à froid à 16.000 g pendant un quart d'heure.

Le surnageant est dialysé contre de l'eau distillée pendant une nuit et l'histone totale ainsi obtenue est lyophilisée.

Les résultats des dosages de N par la méthode de Lubochinsky et coll. (1954), donnent des chiffres variant de 14% à 16%. Les dosages du phosphore par la méthode de Delsal (1958) en révèlent quelquefois des traces, mais en général on n'en trouve pas.

Le spectre d'absorption UV donne une courbe caractéristique des protéines avec un maximum à 278 mμ (Fig. 1). Les dosages du tryptophane par la méthode de Fischl (1960) ont toujours été négatifs.

Après extraction de l'histone, les rapports N/P du désoxyribonucléoprotéide résiduel est de 2,8 à 3,2.

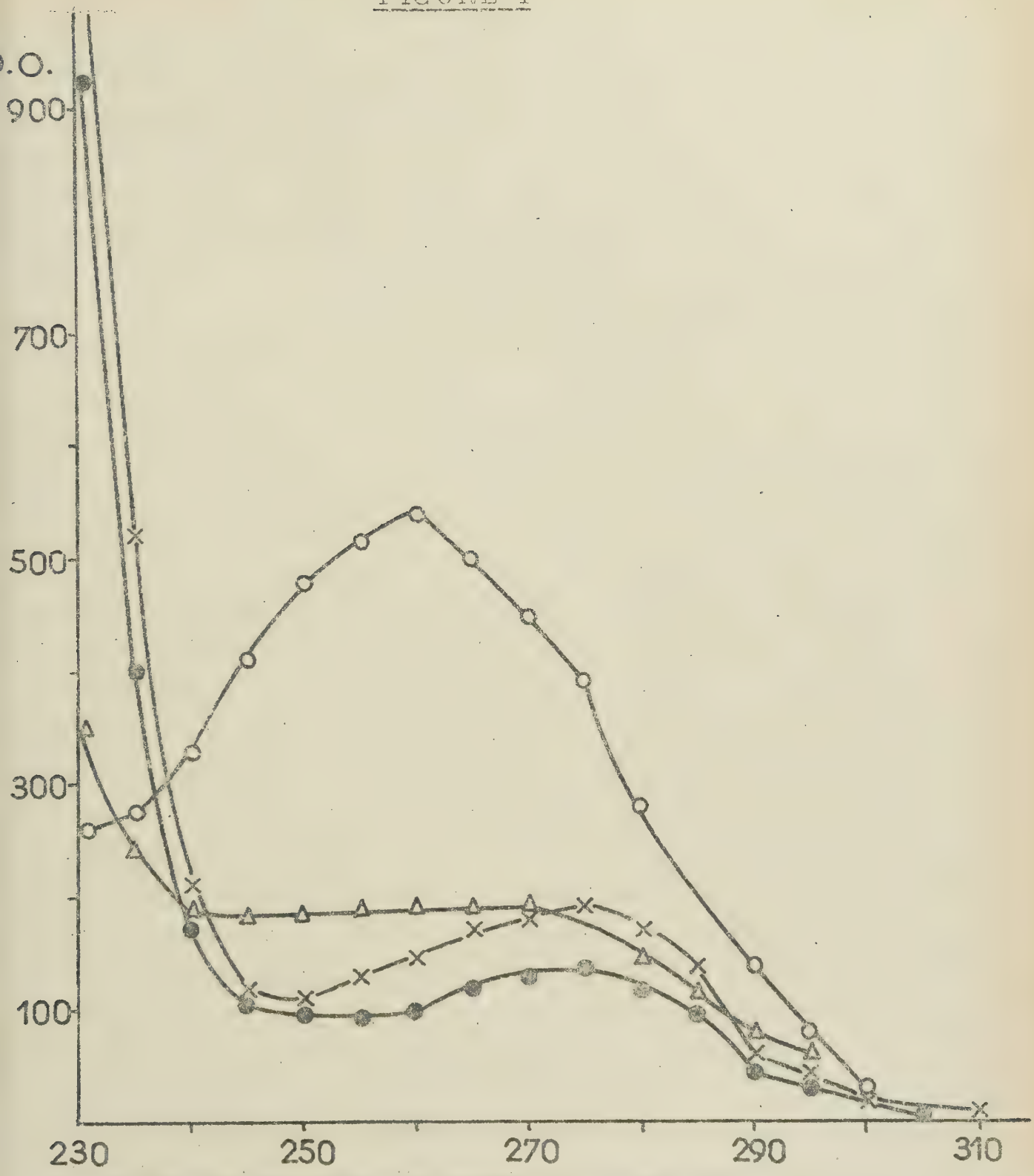
C. FRACTIONNEMENT DE L'HISTONE TOTALE

Nous avons successivement utilisé une méthode personnelle de précipitation et une séparation chromatographique sur carboxyméthylcellulose selon la technique de Phillips et Johns (1959a).

1) Fractionnement par précipitation

On ajoute à froid goutte à goutte à la solution d'histone totale, avant lyophilisation, de la soude 0,02 N. Un précipité se forme à pH 6,5. On centrifuge à froid à 12.000 g et on recueille

FIGURE 1



Spectre d'absorption de l'ADN de placenta humain

Spectre d'absorption de l'histone totale après 1ère extraction

Spectre d'absorption de l'histone totale après 2ème extraction

Spectre d'absorption de l'histone totale après 3ème extraction

(extractions avec HCl 0,2 N à partir de DPN de placenta humain)

le culot et le surnageant. Le culot est dialysé contre de l'eau distillée et lyophilisé; il correspond à l'histone de point isoélectrique 6,5 que nous appellerons au cours de nos expériences, fraction I. Au surnageant, on ajoute de la soude 0,02 N; un précipité se forme à pH 9,0, il est centrifugé, dialysé et lyophilisé. Il correspond à une fraction d'histone que nous appellerons fraction II.

2) Méthode chromatographique

Comme les précipitations ne donnent jamais de fractions homogènes, nous avons eu recours à une méthode de séparation chromatographique. Crampton et coll. (1955) on fait les premiers essais de chromatographie des histones sur colonne de résine IRC-50, avec élution par l'acétate de baryum à des concentrations croissantes; ils ont obtenu trois fractions : deux riches en lysine, et une riche en arginine. Mais ils n'ont récupéré dans l'éluat que 35% de l'histone totale. Luck (1958) a obtenu six fractions d'histone en faisant l'élution avec des concentrations croissantes de chlorure de guanidine dans l'acétate de baryum à pH 6,5, sur colonne d'Amberlite IRC-50; mais si l'élution est effectuée avec du chlorure de guanidine dans un tampon phosphaté à pH 6,5, il n'obtient que trois fractions.

Davison (1957) a employé une colonne de CMC et a élué, avec du chlorure de sodium de concentration croissante, trois fractions. La première, riche en acides aminés dicarboxyliques, correspond à 3% de l'histone totale; la deuxième, riche en lysine, correspond à 12% de l'histone totale; la troisième correspond à 80% de l'histone totale, mais se révèle être un mélange de plusieurs protéines.

Toutes ces méthodes ont l'inconvénient d'utiliser des solutions proches de la neutralité, ce qui provoque l'agrégation de l'histone. C'est pourquoi, nous avons adopté la méthode de fractionnement sur colonne CMC mise au point par Phillips et Johns (1959a)

qui consiste à éluer avec l'acide chlorhydrique à différentes concentrations. Cette méthode permet de récupérer de 80% à 90% de la protéine adsorbée.

Méthode : La carboxyméthylcellulose a été préparée selon la technique de Peterson et Sober (1956). L'expérience a été réalisée à la température du laboratoire.

Préparation de la colonne : A une colonne de 14 cm de longueur et 2 cm de diamètre, on ajoute la carboxyméthylcellulose préalablement mise en suspension dans l'eau. La proportion utilisée est de 5 g de CMC pour 50 à 100 mg d'histone.

L'histone est préalablement dissoute dans 2 ml d'eau distillée. On adsorbe l'histone sur la colonne et on lave avec 20 ml d'eau distillée.

Elution de l'histone : On fait passer à travers la colonne 150 ml de chacune des solutions chlorhydriques suivantes : HCl 0,0020 N, 0, 0025 N, 0,0033 N, 0,005 N, 0,01 N et 0,02 N. On recueille, au moyen d'un collecteur, des fractions de 5 ml, avec un débit de 0,5 ml/minute. L'élution est suivie par l'absorption ultraviolette à 278 mμ au spectrophotomètre Unicam.

Les diagrammes d'élution (Fig. 2) montrent qu'une première fraction A est entraînée par HCl 0,01 N, une seconde par HCl 0,02 N (fraction B). Chacune de ces fractions, lorsqu'on en refait la chromatographie,est éluée par la solution qui l'avait éluée la première fois. On dialyse chacune des deux fractions contre de l'eau distillée pendant 12 heures à 4°C, puis on lyophilise.

Pour calculer la quantité de produits récupérés, on mesure d'abord l'absorption à 278 mμ par mg d'histone totale mise sur la colonne. On mesure aussi cette absorption pour les solutions contenant les fractions A et B. A partir des densités optiques mesurées et, en tenant compte du taux de tyrosine (responsable de

l'absorption mesurée) de chacune des fractions (histone totale : 1,58%; fraction A : 1,22%; fraction B : 3,57%) on calcule le rendement de la séparation chromatographique. On trouve ainsi que la fraction A récupérée constitue 65% de l'histone totale mise sur la colonne, tandis que la fraction B n'en représente que 12%. On voit ainsi que le rendement global de la chromatographie sur colonne de CMC n'est que de 77%.

oooooooo

FIGURE 2

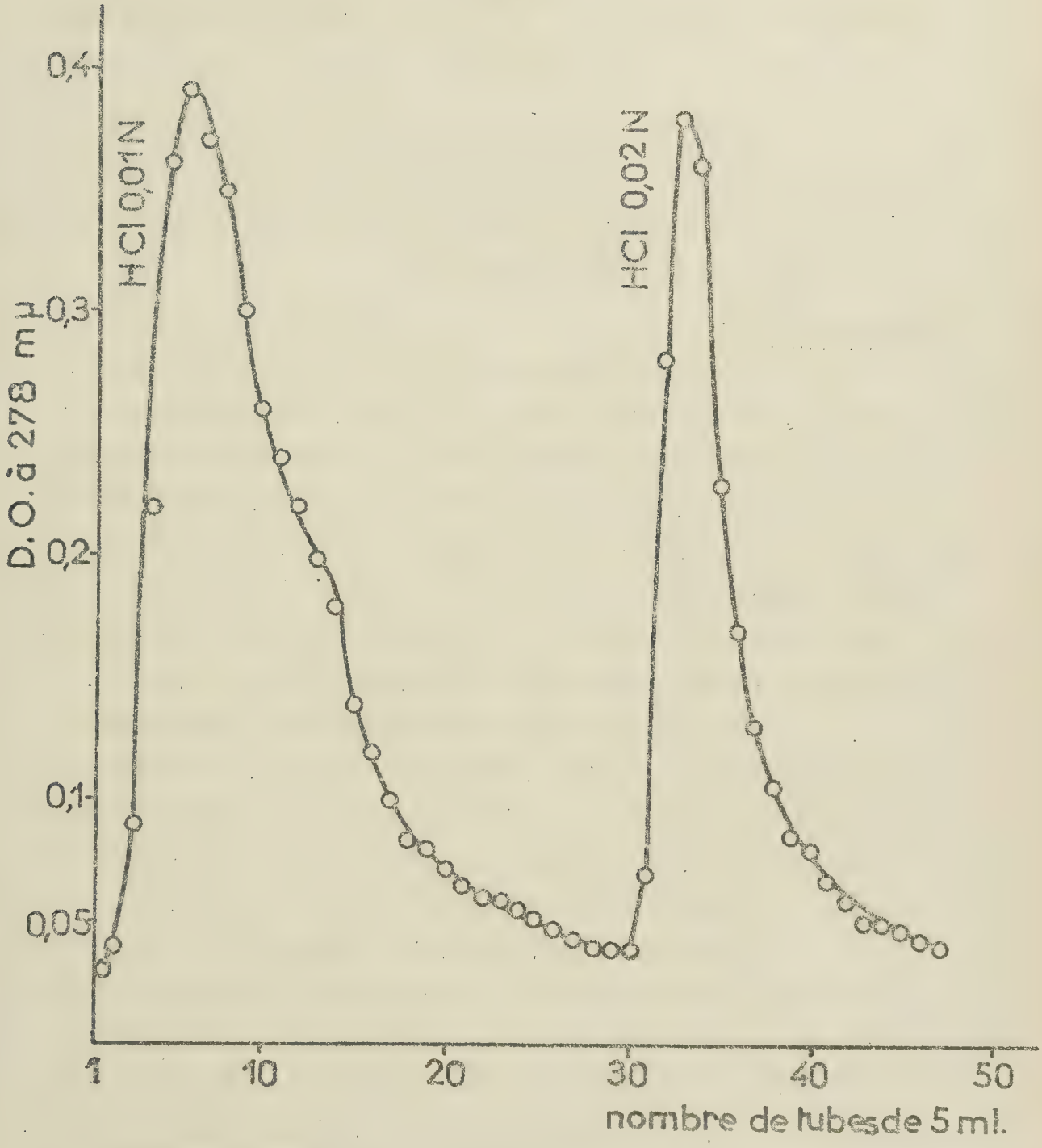


Diagramme d'élution par HCl de l'histone totale absorbée sur colonne de CMC. Les conditions expérimentales sont décrites page 21.

Chapitre II

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES HISTONES DU PLACENTA HUMAIN

Après avoir décrit, dans le chapitre précédent, les diverses techniques de préparation de l'histone du placenta et de ses fractions, nous exposerons maintenant les résultats fournis par l'électrophorèse et l'ultracentrifugation.

A. ELECTROPHORESE

Quelques auteurs ont étudié les histones du thymus de veau par électrophorèse. Ainsi, en 1954, Butler et ses collaborateurs décelèrent dans l'histone totale du thymus deux constituants en opérant à pH 4,5, et trois à pH 8. D'après eux, l'un des produits apparaissant à pH 8 proviendrait de l'agrégation de deux des constituants apparaissant à pH 4,5 et les deux autres seraient les produits d'une action enzymatique. Il n'existerait donc dans l'histone totale du thymus que deux constituants décelables à l'électrophorèse.

Mais lorsque Davison et Butler (1954b) fractionnent cette histone totale par NaCl, NH_4OH et l'acétone, ils obtiennent trois fractions A, B, C qui, à l'électrophorèse, ont des comportements différents. A et C sont homogènes entre pH 4,5 et 8,5, alors que B est homogène à pH 4,5, mais ne l'est plus à pH 8,5.

Grégoire et coll. (1953, 1954) séparent l'histone du thymus en fraction principale et fraction secondaire, par précipitation alcoolique, et montrent qu'à pH 5, la fraction secondaire, soluble dans l'alcool, est formée de trois constituants, tandis que la fraction principale, qui précipite par l'alcool, n'en contient qu'un seul.

Ui (1957) avec le même matériel, mais en fractionnant par l'éthanol-eau à différentes concentrations, obtient deux fractions

I et II. A l'électrophorèse, la fraction I a une mobilité de $6,4 \times 10^{-5} cm^2 volt^{-1} sec^{-1}$, pour la branche montante à pH 5; mais si, à pH constant, on fait varier la force ionique, on constate que l'histone paraît plus homogène. La fraction II, elle, est hétérogène à pH 5 à toutes les forces ioniques étudiées. Ui a mis en évidence 60% d'un constituant de mobilité $8,3 \times 10^{-5} cm^2 volt^{-1} sec^{-1}$ et 40% d'un autre constituant de mobilité non déterminée. Comme les propriétés électrophorétiques des fractions I et II ne sont pas les mêmes entre pH 4,0 et 10,3, Ui conclut que l'histone totale du thymus est formée de quatre constituants dont trois se trouvent dans la fraction I et le quatrième dans la fraction II. Cependant, on peut lui objecter que la fraction II est pondéralement trop faible pour que l'on puisse déceler une hétérogénéité éventuelle.

Cruft et Mauritzen (1957) ont trouvé, dans l'histone totale du thymus, trois constituants principaux et plusieurs constituants secondaires.

On voit donc que les résultats obtenus par ces différents auteurs ne sont pas concordants, mais il faut remarquer que les méthodes de fractionnement qu'ils utilisent ne sont pas les mêmes et qu'elles peuvent, chacune, conduire à des produits finaux différents. Tous ces auteurs sont cependant d'accord sur un point : l'histone totale du thymus de veau est hétérogène.

Rares sont les études électrophorétiques portant sur des histones autres que celles du thymus. Celle du pancréas de jeune boeuf, analysée électrophorétiquement par De Mende, Klyszejko et Khouvine (1960), est, elle aussi, hétérogène. Elle est formée de trois groupes de constituants dont les proportions relatives à tous les pH étudiés sont caractéristiques de cette histone.

Cette courte revue bibliographique montre l'importance

de l'électrophorèse quant à l'étude de l'homogénéité des histones. C'est pourquoi, nous avons analysé l'histone du placenta par électrophorèse, d'abord dans des conditions voisines de celles de Butler (1954), puis en faisant varier quelques facteurs afin de pouvoir tirer des conclusions de nos premiers résultats.

1) Etude électrophorétique de l'histone totale

a) A différents pH

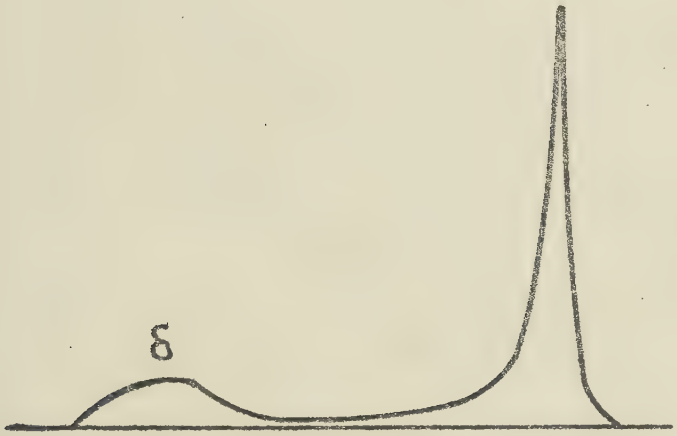
L'histone totale obtenue par la technique décrite dans le chapitre I est lyophilisée. On la dissout dans un tampon véronal-acétate de sodium de pH différents : 4,8; 6,8; 8,6; 9,6, dont la force ionique (0,1) est maintenue constante par addition de NaCl à différentes concentrations. Chaque solution, qui contient 1% d'histone est dialysée pendant 12 heures contre 1 ou 2 litres du tampon correspondant.

Les électrophorèses sont faites dans l'appareil de Kern à 23° (le gradient de potentiel est de 5 à 6 volt/cm) pendant 1800 sec. Nos résultats, consignés dans le Tableau I, ont été corrigés pour 2°C et ils sont ainsi comparables à ceux que donne l'appareil de Tiselius*. Dans ce tableau, on trouvera les mobilités et les pourcentages des fractions obtenues pour tous les pH étudiés.

Les résultats du Tableau I (et Fig. 3, 4, 5, 6) montrent l'influence du pH sur les diagrammes électrophorétiques. A pH 4,8, on constate que l'histone totale semble formée d'un seul constituant, ce qui pourrait laisser croire qu'elle est homogène. Mais à pH 6,8, on décèle trois constituants dont le plus rapide représente 66% de l'histone totale et le moins rapide, 8%. A pH 8,6, apparaît un quatrième constituant, tandis qu'à pH 9,6, un des constituants

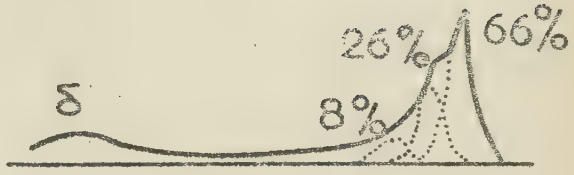
* Le rapport des mobilités à 2° et à 23° est inversement proportionnel au rapport des viscosités de l'eau à ces deux températures (Johnson et Shooter ,1948). La mobilité à 2° vaut donc 0,559 fois celle à 23°.

FIGURES 3, 4, 5, 6



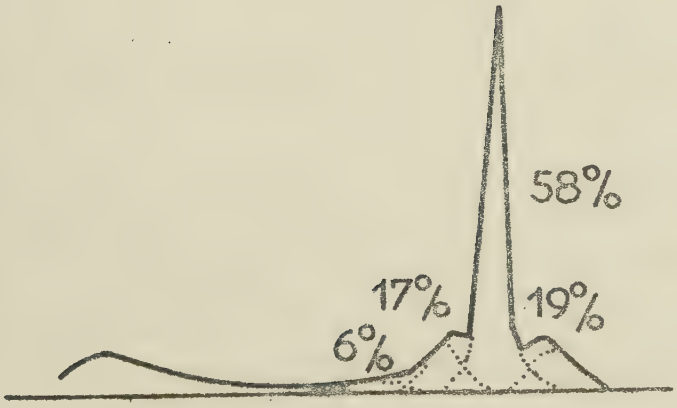
pH 4,7

Fig. 3



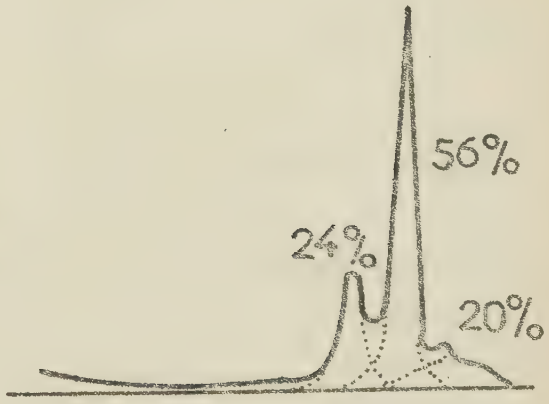
pH 6,8

Fig. 4



pH 8,6

Fig. 5



pH 9,6

Fig. 6

Eléctrophorèse de l'histone totale à différents pH (tampon veronal sodique
(force ionique 0, 1)

Les conditions expérimentales sont décrites page 26.

disparaît. On ne retrouve à pH 9,6 que trois constituants qui ne semblent pas être les mêmes que ceux qui apparaissent à pH 6,8, leurs proportions étant différentes.

TABLEAU I

Mobilité électrophorétique de l'histone totale du placenta humain à différents pH (tampons de Michaelis de force ionique =0, 1).

pH	mobilité ($cm^2 volt^{-1} sec^{-1}$) x 10^5	pourcentage
4,8	11,9	100
6,8	7,9	8
	9,6	26
	10,3	66
8,6	5,7	6
	7,3	17
	8,5	58
	9,9	19
9,6	5,8	24
	7,0	56
	7,9	20
11,5	-2,6	18
	-7,0	82

Aux pH alcalins, les mobilités diminuent puisqu'on se rapproche du point isolélectrique.

De ces premiers diagrammes d'électrophorèse, on peut conclure que l'histone du placenta est hétérogène et que son hétérogénéité augmente au fur et à mesure qu'on augmente le pH. On peut se demander si ce phénomène est réversible ou s'il correspond à une dénaturation.

b) Electrophorèses de l'histone totale après deux dialyses à différents pH.

Pour répondre à ces questions, nous avons dialysé deux solutions à 1% de la même histone contre des tampons au véronal sodique à pH 4,8, 6,8 et 8,6. Après les dialyses, une partie de

chaque solution d'histone a été soumise à l'électrophorèse tandis que l'autre partie a été dialysée une seconde fois. La solution à pH 6,8 a été dialysée contre une solution à pH 4,3 et les solutions à pH 4,8 et 8,6 ont été dialysées contre un tampon à pH 6,8. C'est-à-dire que nous avons étudié la réversibilité totale et le retour à un pH voisin de la neutralité en partant d'un pH alcalin ou acide.

Après les dialyses, les solutions sont toujours centrifugées, pour ne soumettre à l'électrophorèse que des solutions parfaitement limpides. Nous avons utilisé l'appareil de Kern à 23°; le gradient de potentiel est de 5 à 6 volt/cm pendant 1800 s. Nos résultats sont consignés dans le Tableau II et les mobilités sont corrigées pour 2°C (voir p.26).

Dans la première colonne, on retrouve les résultats du Tableau I, puisqu'ils sont également obtenus après une seule dialyse. Dans les suivantes sont consignés les résultats obtenus après la deuxième dialyse à pH 6,8. On constate qu'après cette deuxième dialyse, l'histone est formée de trois constituants, comme si on ne l'avait dialysée qu'une seule fois à pH 6,8.

L'unique constituant trouvé à pH 4,8, s'est transformé en trois constituants, et le quatrième constituant trouvé à pH 8,6 a disparu. De plus, les mobilités et les pourcentages des constituants sont les mêmes qu'après une seule dialyse à pH 6,8. En revanche, quand nous dialysons d'abord à pH 6,8, puis à pH 4,8, nous ne retrouvons qu'un seul constituant, comme lorsque nous dialysons à pH 4,8 (voir Tableau I), mais la mobilité est plus faible (Fig.7,8).

Puisque le phénomène est réversible et que cette réversibilité dépend, elle aussi, du pH, l'hétérogénéité que nous avions mise en évidence par les variations du pH, ne s'accompagne donc pas d'une dénaturation.

FIGURES 7, 8

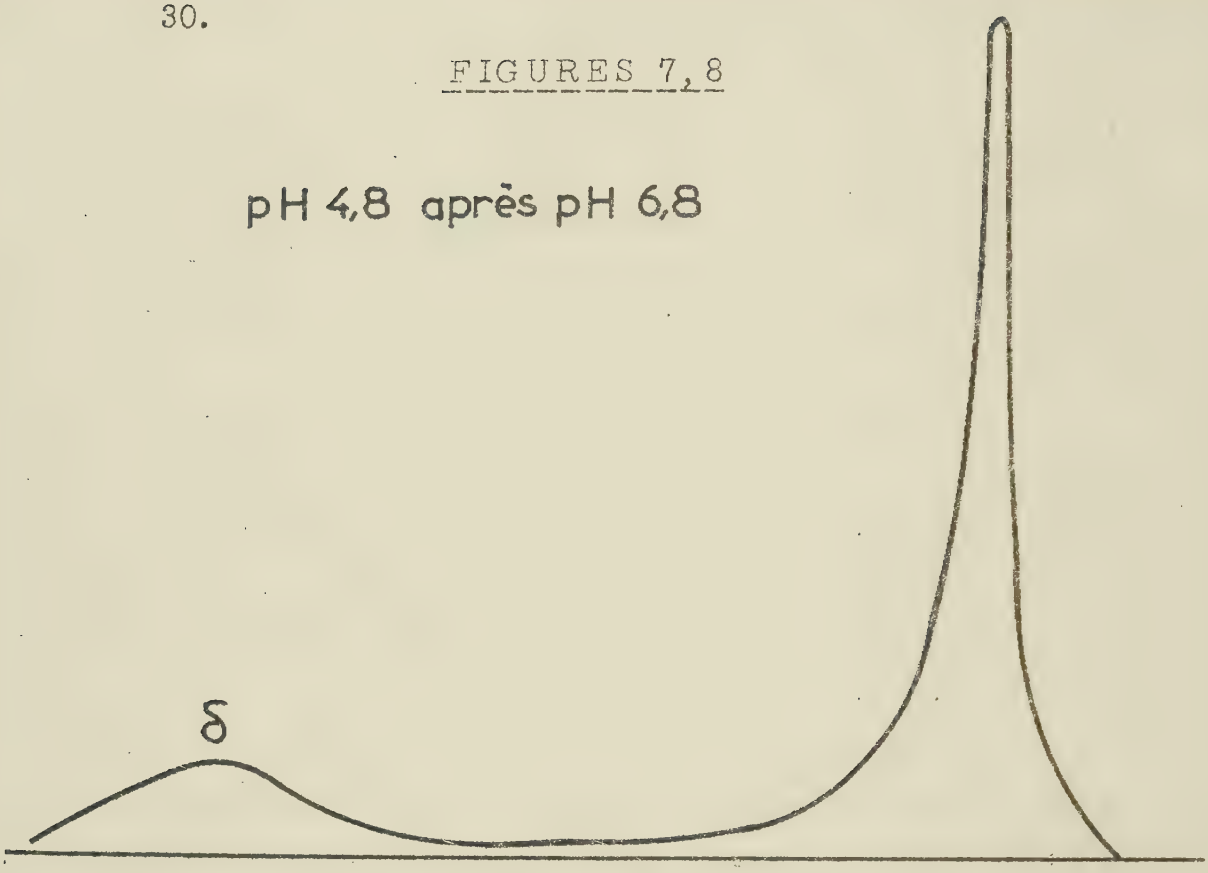


Fig. 7

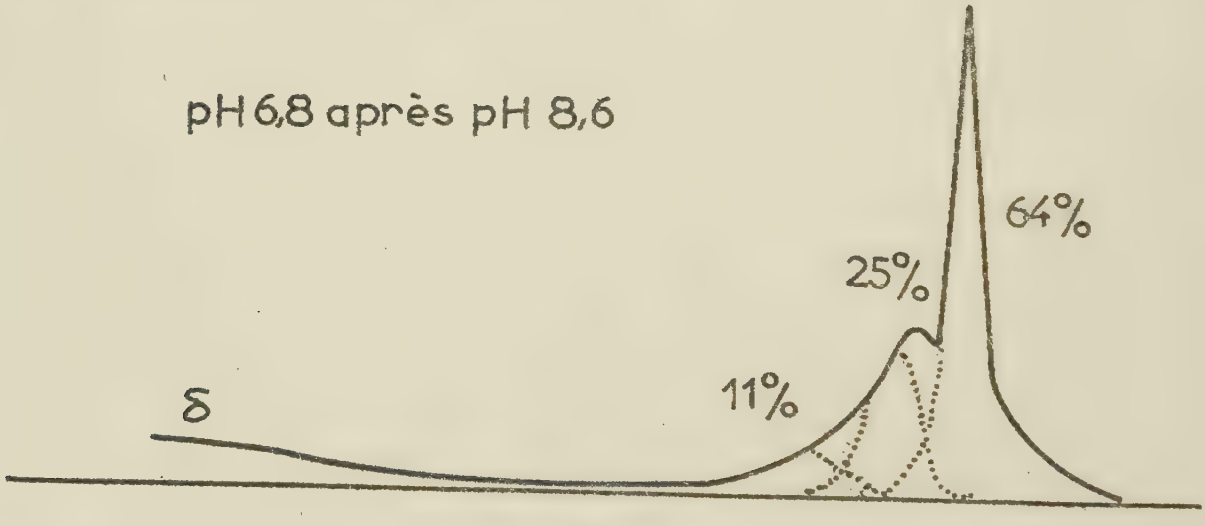


Fig. 8

Eléctrophorèse de l'histone totale après deux analyses à différents pH. Les conditions expérimentales sont décrites page 28.

TABLEAU II

Mobilité électrophorétique de l'histone totale après deux dialyses à pH différents (tampons de Michaelis de force ionique = 0, 1).

pH 1ère dialyse	pH 2ème dialyse	mobilité ($cm^2 volt^{-1} sec^{-1}$) x 10^5	pourcentage
6,8	6,8	7,8	8
		9,6	26
		10,8	66
4,8	6,8	8,1	8
		9,4	28
		10,3	64
6,8	4,8	9,6	100
8,6	6,8	8,1	11
		9,3	25
		10,4	64

c) Action du diisopropylfluorophosphate

Il est possible que le phénomène de réversibilité ne dépende pas uniquement du pH, comme le pensent quelques auteurs (Smillie, 1958; Phillips et Johns, 1959b), mais que l'apparition de nouveaux constituants à des pH alcalins soit provoquée par une protéolyse réversible (Bergman, 1937). En effet, Phillips et Johns (1959b) ont montré, avec l'histone du thymus de veau, que le nombre des groupements N-terminaux diminue en présence de DFP, et ils pensent que le DFP inhibe la transformation protéolytique de l'histone totale en plusieurs constituants. Nous pouvions, comme ces auteurs l'ont fait pour l'histone du thymus, supposer que l'apparition de constituants à pH 8,6 est due à une protéolyse , mais que cette protéolyse est réversible. Pour nous en assurer, nous avons dialysé les solutions contre des tampons

contenant du DFP, à la concentration finale de 1 mM. Nos résultats sont résumés dans le Tableau III.

TABLEAU III

Mobilités électrophorétiques de l'histone totale du placenta humain en présence de DFP (diisopropylfluorophosphate).

pH	sans DFP		avec DFP	
	u*	%	u*	%
4,8	11,9	100	11,7	100
6,8	7,8	8	6,8	4
	9,6	26	7,9	30
	10,8	66	9,0	66
8,6	5,7	6	5,5	32
	7,3	17	6,7	47
	8,5	58	7,4	21
	9,9	19		

* u = mobilité en $(cm^2 volt^{-1} sec^{-1}) \times 10^5$

Les résultats du Tableau III montrent que le DFP ne modifie pas le nombre de constituants qui apparaissent pendant l'électrophorèse à pH 4,8 et 6,8. En revanche, à pH 8,6, le nombre de constituants diminue. On n'en trouve plus que trois au lieu de quatre et les mobilités ne sont plus les mêmes. Le constituant le plus rapide a disparu, les autres ont des mobilités plus faibles et la proportion de ceux de faible mobilité a augmenté. Or, c'est à pH 8,6 qu'une protéolyse du genre chymotrypsique peut se produire et nos résultats laissent donc supposer qu'à ce pH l'histone du placenta a un certain pouvoir protéolytique. Cependant, nous avons montré que le DFP n'empêche pas les phénomènes d'association et de dissociation réversibles, en refaisant les expériences de double dialyse décrites plus haut, mais avec addition de DFP à la concentration de 1 mM par litre

de solution de dialyse, et en dialysant d'abord à pH 4,8, 6,8 et 8,6, puis une deuxième fois à pH 6,8. Les résultats des électrophorèses sont consignés dans le Tableau IV.

TABLEAU IV

Mobilités électrophorétiques de l'histone totale après deux dialyses à différents pH en présence de DFP (diisopropylfluorophosphate).

pH 1ère dialyse	pH 2ème dialyse	u	%
6,8	6,8	6,8	4
		7,9	30
		9,0	66
4,8	6,8	6,4	8
		8,5	28
		9,4	64
8,6	6,8	7,2	6
		8,4	27
		9,5	67

Les résultats du Tableau IV permettent encore de conclure que l'histone totale du placenta humain présente à l'électrophorèse plusieurs fractions qui sont en équilibre et qui s'associent et se dissocient en fonction du pH. Par conséquent, en présence de DFP, la réversibilité est complète de même qu'en son absence, mais il apparaît que la décomposition réversible en plusieurs constituants à pH 8,6 est due à la fois à une dissociation et à une protéolyse.

Enfin, et comme nous le montrerons plus loin, la réversibilité du phénomène d'association et de dissociation que montrent les diagrammes d'électrophorèse, est confirmée par les calculs des constantes de sédimentation; elle n'est, réellement, fonction que de la concentration en ions hydrogène.

2) Electrophorèse des fractions I et II

L'hétérogénéité que nous venons de mettre en évidence dans l'histone totale peut-elle être également décelée dans les fractions que nous avons obtenues par voie chimique et dont nous avons décrit la préparation dans le chapitre I .

Nous rappellerons que ces deux fractions sont obtenues par précipitation à deux pH, 6,5 pour la fraction I et 9,0 pour la fraction II. Ces deux fractions sont semblables à celles qu'avait obtenu Ui (1956).

Ces fractions ont été dissoutes dans un tampon acétate et dialysées pendant 12 heures, contre le même tampon à pH 4,3. Nous avons remarqué, au cours de la préparation de ces fractions, que la dialyse de l'extrait chlorhydrique de l'histone totale ne doit pas durer plus de 12 heures, sinon le précipité à pH 6,5 n'apparaît pas. Il est possible que l'histone se dégrade en solution acide. On peut rapprocher de cette observation celle de Bakay (1957), constatant que la quantité d'azote de l'histone non dialysable diminue en fonction du pH et de la durée de la dialyse.

Les résultats des électrophorèses des fractions I et II sont résumées dans le Tableau V où nous les comparons aussi à ceux de Ui (1957) obtenues avec des fractions de l'histone du thymus précipitées par le mélange éthanol-eau.

Les chiffres du Tableau V montrent que les fractions I et II semblent homogènes, puisqu'on ne peut déceler qu'un seul constituant. La fraction II, la plus riche en arginine, a une mobilité plus petite que la fraction I.

D'autre part, si on compare les valeurs de mobilité électrophorétique de l'histone totale au même pH, mais dans des tampons de force ionique 0,1 et 0,2,on constate une grande différence qui s'explique par la variation de la force ionique. Des résultats similaires ont été obtenus par Ui (1957).

TABLEAU V

Mobilités électrophorétiques de l'histone totale et de ses fractions I et II (tampon acétate de force ionique = 0,2).

tissu	placenta	thymus de veau (Ui)
pH du tampon acétique	4,3	5,0
histone totale	6,7	
fraction I	9,8	8,3
fraction II	6,6	6,4

mobilité : $(cm^2 volt^{-1} sec^{-1}) \times 10^5$

3) Electrophorèse des fractions A et B

L'obtention des fractions A et B a été décrite dans le chapitre I (fraction A éluée par HCl 0,01 N, fraction B éluée par HCl 0,02 N, après adsorption sur colonne de carboxyméthylcellulose). Nous avons étudié ces fractions par électrophorèse comme les fractions I et II ; nous en avons fait des solutions à 1% dans le tampon véronal sodique et les électrophorèses ont été effectuées dans l'appareil de Kern à 23°C.

Les résultats, ramenés à 2°C, sont consignés dans les Tableaux VI et VII.

En comparant les Tableaux II et VI, on voit que la fraction A est très voisine de l'histone totale. Elle est formée, comme elle, de plusieurs constituants qui apparaissent et disparaissent réversiblement à différents pH, sauf à pH 8,4. A ce dernier pH, il est possible que la protéolyse soit assez forte pour que la réversibilité ne se manifeste pas.

La fraction B se comporte d'une manière tout à fait différente. Les constituants qui apparaissent au cours des électrophorèses

TABLEAU VI

Electrophorèse des fractions A et B à différents pH (tampon au véronal sodique, de force ionique 0, 1).

pH	fraction A		fraction B	
	u	%	u	%
4, 7	9, 5	7	9	9
	11, 5	93	11	91
6, 8	7, 8	6	7, 3	6
	9, 0	25	8, 3	14
	10, 2	69	9, 6	80
8, 4	5, 8	7	4, 7	10
	7, 5	23	7, 0	66
	8, 8	55	9, 5	24
	9, 7	15		
12, 0	- 3, 9	11	- 9, 3	16
	- 6, 5	11	- 11, 4	54
	- 9, 0	54	- 13, 6	30
	- 11, 0	24		

conditions expérimentales, voir page 26

TABLEAU VII

Electrophorèse des fractions A et B après deux dialyses successives à différents pH (tampon au véronal sodique de force ionique 0, 1)

pH		fraction A		fraction B	
1ère dialyse	2ème dialyse	u	%	u	%
6, 8	6, 8	7, 8	6	7	6
		9	25	8, 3	14
		10, 2	69	9, 6	80
4, 8	6, 8	7, 2	6	9, 1	81
		8, 6	23	10, 8	19
		9, 7	71		
6, 8	4, 8	9, 3	100	8, 5	100
8, 4	6, 8	8, 7	13	9, 3	80
		10, 3	87	11	20

conditions expérimentales, voir page 28

ont des mobilités très différentes de celles des constituants de l'histone totale et, de plus, les phénomènes de dissociation ne sont pas réversibles.

Si l'on rapproche ces résultats de ceux donnés par les analyses chimiques (cf. chapitre III), on peut conclure que cette fraction B n'est semblable, ni à l' histone totale, ni à la fraction A. Elle n'a, en effet, ni le comportement électrophor étique, ni les mêmes teneurs en acides aminés, ni les mêmes groupes terminaux, et enfin, elle contient des lipides, alors que la fraction A n'en contient pas.

Propriétés électrophorétique des fractions I et II.

Explication théorique : Si l'on étudie l'aspect des courbes d'électrophorèse des fractions I et II (Fig. 9), on remarque que la courbe de la fraction I a des caractères particuliers que n'ont pas celle de la fraction II, ni celle de l'histone totale. D'autres auteurs ont également trouvé ces caractères, mais ils n'ont pas cherché à les expliquer.

Ces caractères particuliers sont les suivants :

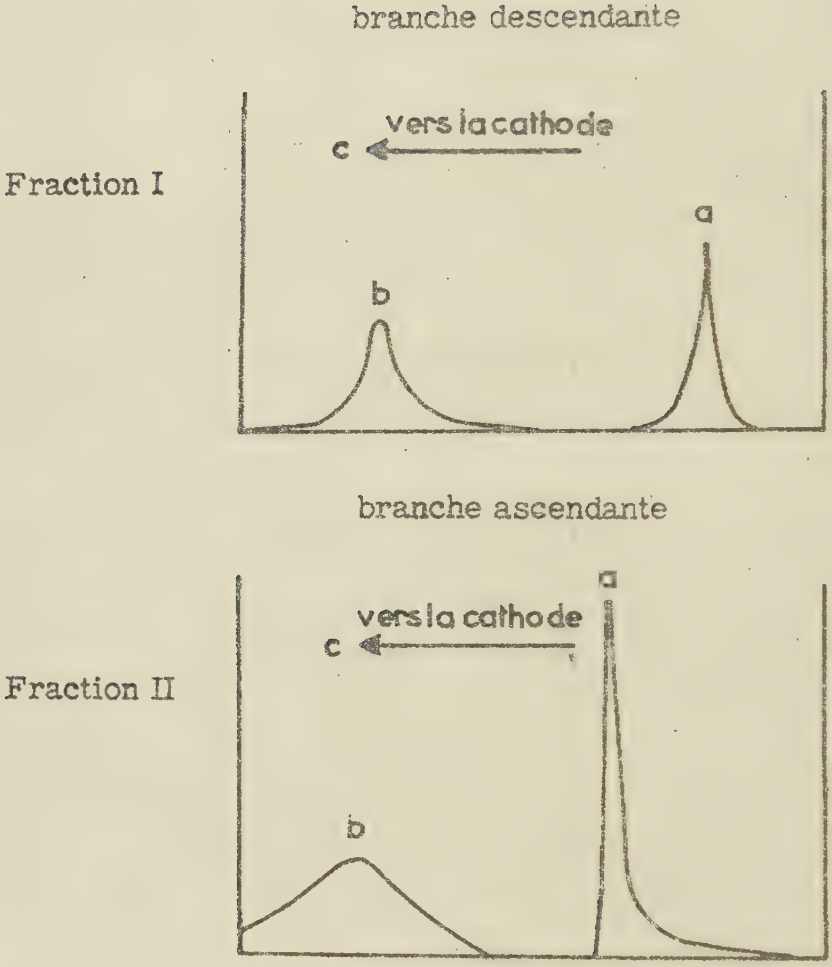
1° -- A pH acide, la frontière ascendante n'a pas d'axe de symétrie. Le pic reste simple, sans tendance à se décomposer, mais son bord antérieur devient rectiligne alors que son bord postérieur a tendance à traîner quelque peu. La courbe est aigüe, étroite pour la branche montante; en revanche la frontière descendante est très étalée, mais ne se sépare jamais en plusieurs constituants distincts.

2° -- Si l'on calcule les mobilités par la méthode habituelle de la médiane, en partant de la formule :

$$u = \frac{X}{vt},$$

où u représente la mobilité, X la distance parcourue par la frontière, v le gradient de potentiel et t la durée de l'expérience, on constate que les mobilités des frontières ascendantes et descendantes sont

FIGURE 9



a : frontière ascendante
b : frontière descendante
c : sens du déplacement électrophorétique

Diagramme électrophorétique de la Fraction I et de la Fraction II à pH 4, 5 (tampon acétate, force ionique 0, 2).
Les conditions expérimentales sont décrites page 34.

tout à fait différentes.

Ces deux caractères de la fraction I, dissymétrie et mobilités différentes pour chaque frontière, ne se retrouvent pas pour la fraction II ni pour l'histone totale.

Des phénomènes analogues à ceux que nous observons avec la fraction I ont déjà été décrits pour l'électrophorèse des protéines, lorsqu'il existe des interactions moléculaires (Gilbert et coll., 1956). Longsworth et McInnes (1940-42) ont proposé une explication d'un phénomène semblable observé au cours d'électrophorèses de mélanges d'ovalbumine et d'acide nucléique.

D'après eux, il se formerait un complexe réversible d'ovalbumine et d'acide nucléique, selon la formule :

$$P + N \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P \cdot N$$

où la constante d'équilibre $K = \frac{k_1}{k_{-1}}$

et où k_1 est la constante de vitesse d'association et k_{-1} la constante de vitesse de dissociation.

L'aspect des frontières variera en fonction de k_1 et de k_{-1}. Dans le cas où les deux frontières sont semblables et symétriques, k_1 et k_{-1} ont des valeurs élevées et très voisines l'une de l'autre. Par contre, si k_1 est différent de k_{-1}, l'aspect des frontières n'est pas le même et les mobilités ont des valeurs différentes, puisqu'il y a prédominance de la dissociation ou de l'association.

Cette explication de Longsworth et McInnes peut s'appliquer non seulement à la protéinase de Micrococcus P., comme l'ont fait Colobert et de Mende (1956), mais également à la fraction I de l'histone totale du placenta.

Nous pouvons donc considérer que, dans la branche descendante, il y a association, et dans la branche ascendante,

dissociation, ce qui expliquerait les différences trouvées entre les mobilités.

Il nous reste à expliquer l'étalement de la branche descendante. Pour cela, nous pouvons admettre, comme l'ont fait Colobert et de Mende (1956) pour la protéinase, que la charge nette des produits associés est plus grande que celle des produits dissociés. Seule cette condition permet d'expliquer les faits expérimentaux.

Dans la branche descendante, où il y a étalement, la valeur moyenne de la mobilité, pour une abscisse donnée x dans le tube d'électrophorèse, croît en même temps que x. Le champs électrique croissant en même temps que x provoquerait l'étalement de la frontière descendante et cet effet s'ajouterait à celui de la diffusion.

Les mobilités calculées à l'aide de cette frontière sont non seulement celles des produits dissociés (produits de départ), mais aussi celles des produits associés. Il est donc naturel que de cette manière, nous ne retrouvions jamais un constituant dont la mobilité moyenne soit aussi grande que celle déterminée par la frontière ascendante. D'autre part, la frontière descendante ne peut être décomposée en courbes de Gauss; c'est pourquoi les mobilités calculées pour chaque constituant à l'aide de la branche descendante n'ont pas grande signification physique. Nous n'avons donc tenu compte que des mobilités calculées au moyen de la branche ascendante. Dans cette branche, la valeur de la mobilité diminue lorsque x croît, l'étalement sera pratiquement nul et ne sera provoqué que par la diffusion. Les valeurs des mobilités correspondront sensiblement à celles du produit dissocié.

Il nous reste encore une propriété de la fraction I à expliquer. Cette fraction ne précipite plus à pH 6,5, si la solution

d'histone totale a été conservée 8 jours à la glacière dans HCl 0,2 N. Après un tel séjour, à 4°C environ, on obtient seulement un précipité à pH 9,0 dont les propriétés électrophorétiques et de sédimentation sont celles de la fraction II, comme le montre le Tableau VIII.

TABLEAU VIII

Effet de la conservation de la solution chlorhydrique d'histone totale à 4° pendant 8 jours sur les propriétés des fractions I et II.

	I		II
mobilité à pH 4,3 (force ionique = 0,2)	9,8		6,6
-- après 8 jours à 4°C	6,5		6,4
constante de sédimentation	0,7	6,1	2,4
	78%	22%	100%
-- après 8 jours à 4°C	2,4		2,8
	100%		100%

Cette transformation de l'histone totale est irréversible. On peut, en effet, redissoudre l'histone après précipitation à pH 9, mais il n'est plus possible d'obtenir une fraction à pH 6,5. Il semble que la propriété de polymérisation que possède la fraction I se manifeste même lorsqu'elle est en solution avec le mélange de fractions qui constituent l'histone totale.

Monty et Dounce (1959) ont trouvé également dans les histones du foie de rat des fractions qui se polymérisent irréversiblement, mais ils n'en ont pas déterminé les points isoélectriques. D'autre part, des histones précipitant à pH 6,5 ont été trouvées dans des tissus cancéreux et dans le pancréas. On pourrait supposer qu'elles correspondent à un type de protéine de constitution intermédiaire entre les histones typiques et les protéines dites résiduelles, fortement attachées

à l'ADN.

En résumé, la fraction I se distingue de toutes les autres par son comportement électrophorétique qui traduit la possibilité d'une association et d'une dissociation, tantôt réversible, tantôt irréversible, suivant les conditions expérimentales. Par contre, les fractions II, A, et l'histone totale ont le même comportement : elles s'associent ou se dissocient réversiblement en fonction du pH. Quant à la dissociation de la fraction B, elle est irréversible. Enfin, nous pouvons dire que, par fractionnement isoélectrique et chromatographique, on obtient des fractions qui, examinées par électrophorèse, ne sont ni homogènes, ni bien définies.

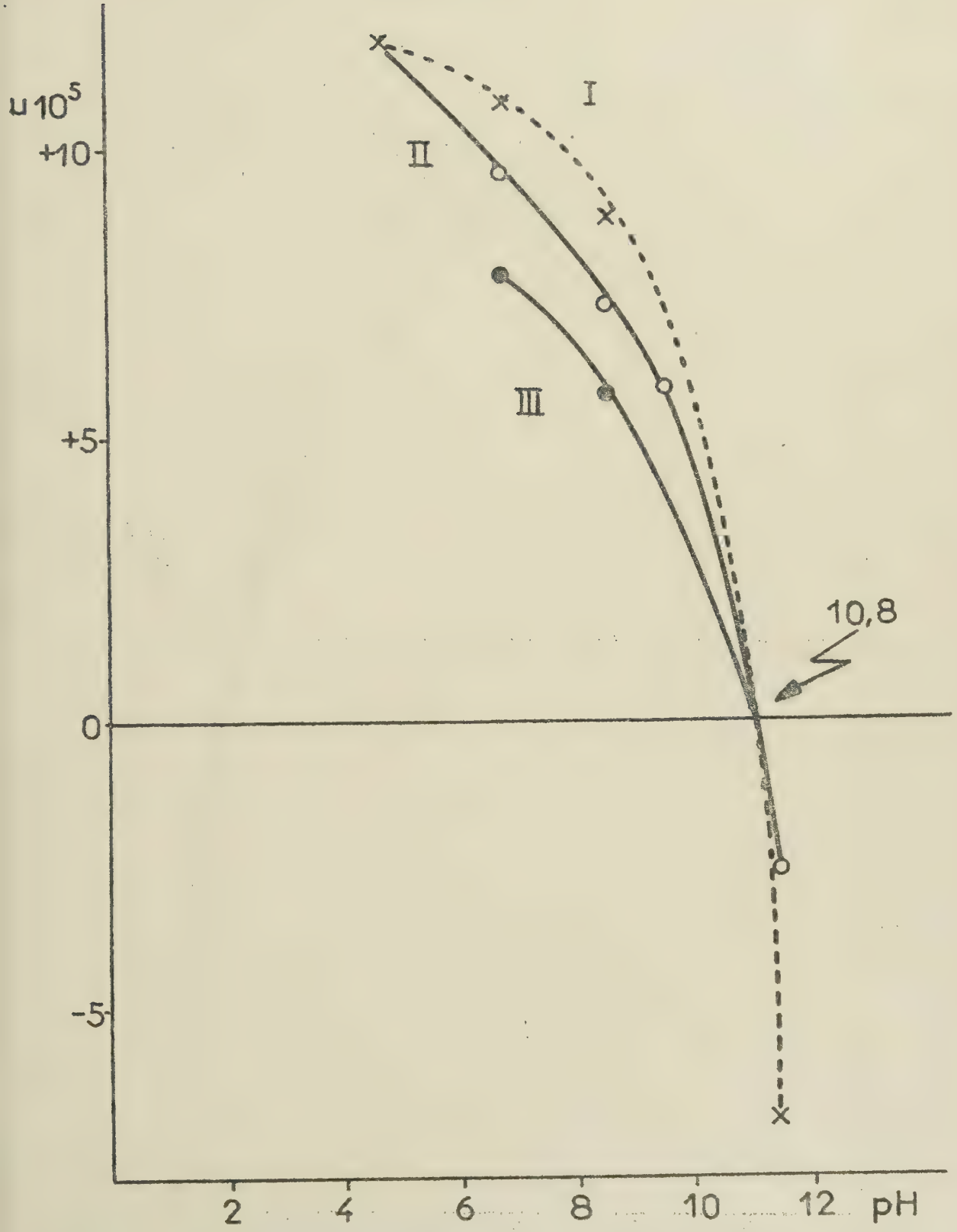
4) Point isoélectrique de l'histone totale et des fractions A et B.

Détermination du point isoélectrique par la méthode graphique

La Figure 10 représente les courbes que nous avons tracées en portant en abscisses les pH et en ordonnées les mobilités, telles qu'elles figurent dans le Tableau I.

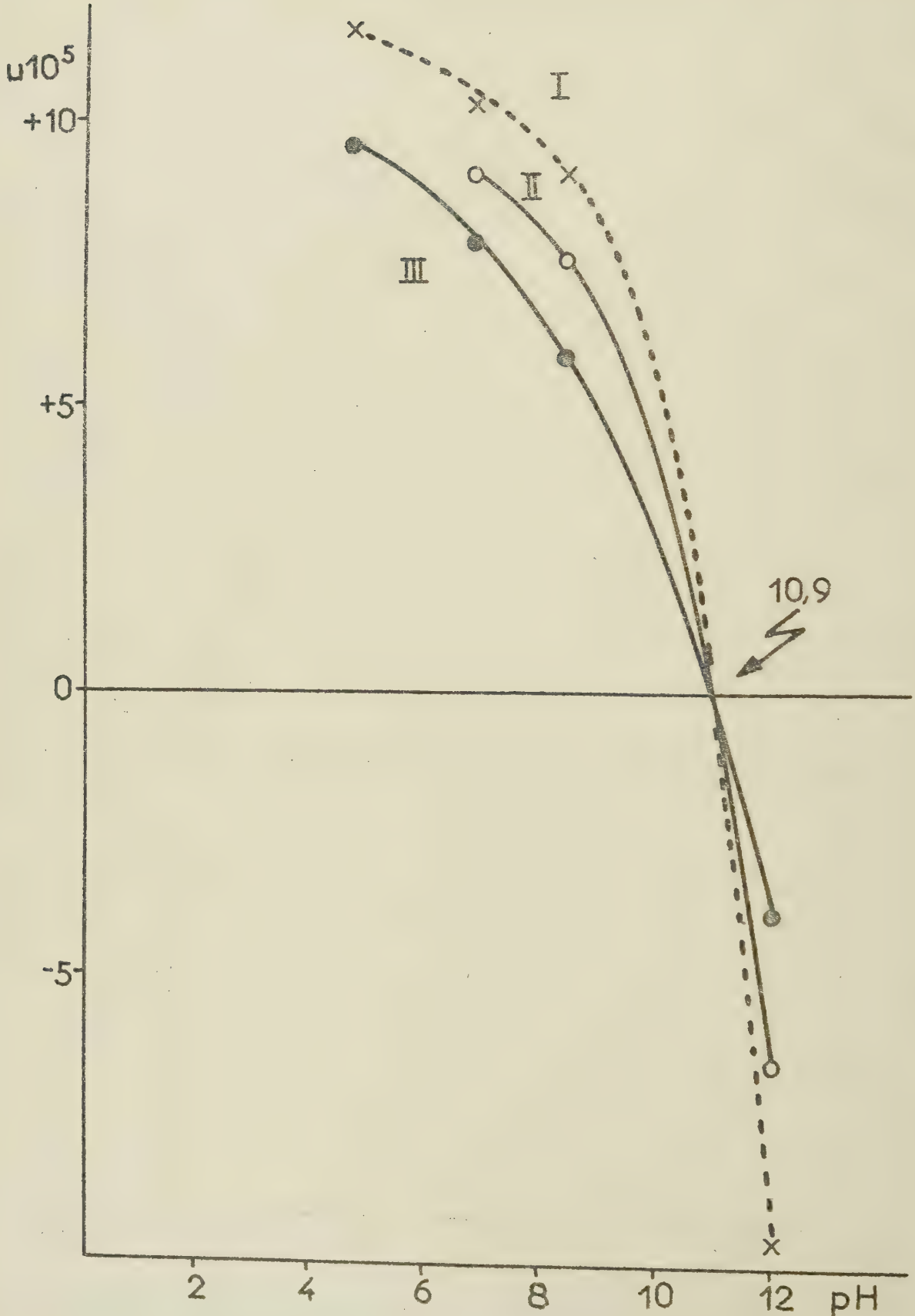
Afin de rendre les mobilités comparables entre elles, lorsque nous faisons varier le pH, nous avons utilisé le même tampon et maintenu la force ionique constante. Nous avons choisi le tampon de Michaelis, au véronal sodique - acétate de sodium, efficace entre les pH 2,6

FIGURE 10



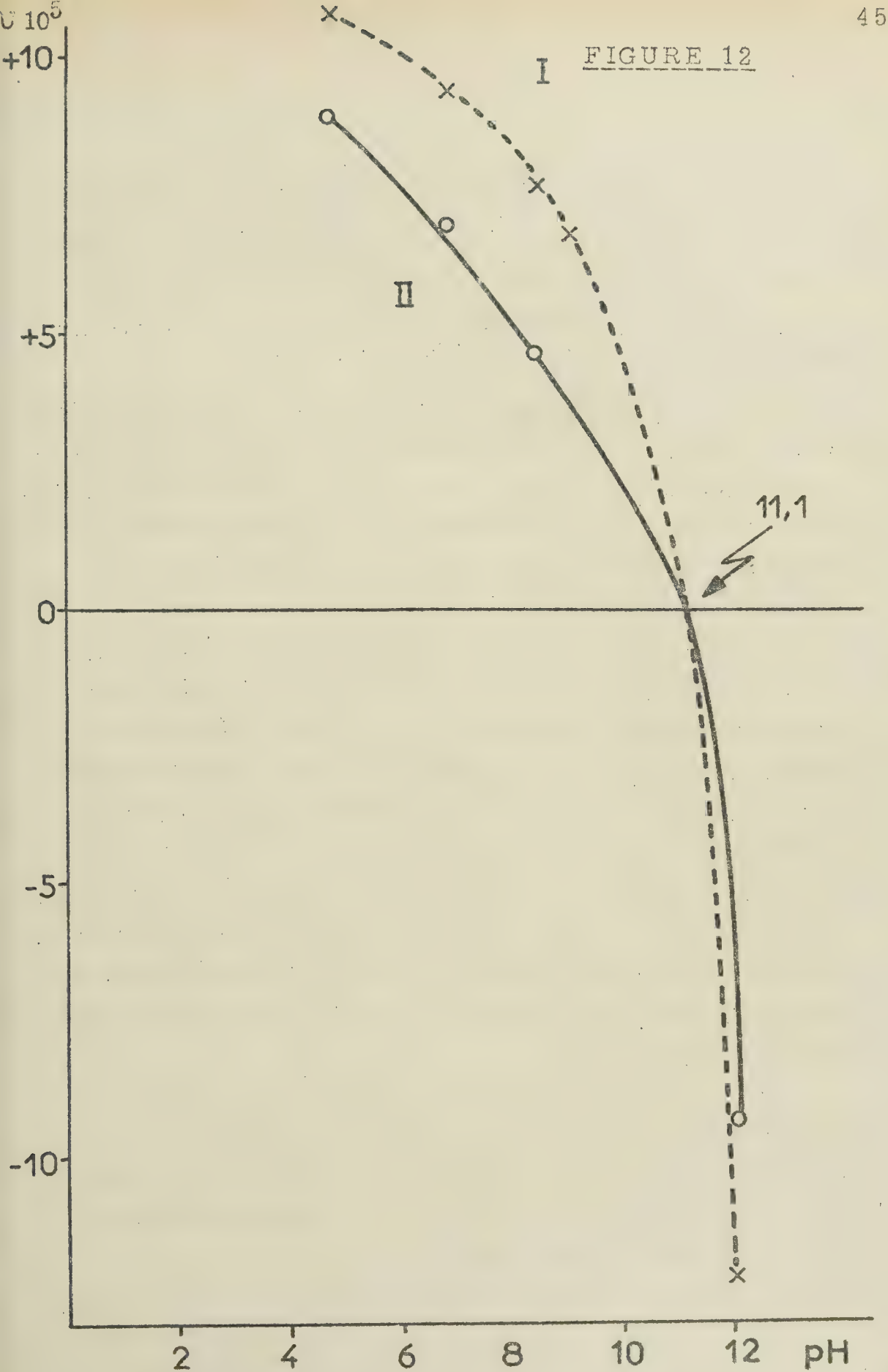
Détermination graphique du point isoélectrique de l'histone totale.
Les conditions expérimentales sont décrites page 46.

FIGURE 11



Détermination graphique du point isoélectrique de la Fraction A.
Les conditions expérimentales

FIGURE 12



Détermination du point isoélectrique de la Fraction B.

et 9,6 et nous avons maintenu la force ionique constante à 0,1 en ajoutant du chlorure de sodium. Pour les électrophorèses faites à des pH plus élevés que 11,5, nous avons utilisé un tampon phosphate et observé que les points obtenus pour ce tampon se placent sur le prolongement des courbes obtenues pour le tampon de Michaelis; les deux courbes se raccordent parfaitement.

Conditions expérimentales : Les solutions d'histone sont à 1%, la conductibilité spécifique du tampon est pratiquement constante pour toutes les valeurs du pH (0,0040 mho/cm), l'intensité du courant est de 20 mA, le gradient de potentiel est de 5 à 6 volts/cm et la température est de 25°C. Les mobilités ont été corrigées pour la température de 2°C.

Pour construire les courbes des Figures 10, 11 et 12, nous avons supposé que l'apparition des constituants secondaires correspond à un changement d'équilibre entre les diverses fractions qui forment l'histone totale, et que cette apparition ou disparition n'est fonction que du pH. Nous pouvons donc, pour chaque pH, grouper les constituants dont les pourcentages globaux sont voisins et dont la mobilité seule varie, et encore faiblement (écart inférieur à 10%). En opérant ainsi, nous obtenons, pour l'histone totale, trois groupes. Deux sont très importants puisqu'ils totalisent 93% de l'histone. Le troisième groupe n'apparaît qu'à pH 6,8 et 8,6 et ne représente que 6 à 8% de l'histone.

Nous appellerons "groupe I" celui où se trouvent les constituants les plus rapides et qui représente environ 72% de l'histone totale, "groupe II" celui qui comprend environ 21% de constituants de mobilités intermédiaires, et "groupe III" celui qui renferme environ 7% de constituants les plus lents.

Si nous admettons, comme nous l'avons proposé plus haut,

que des associations et des dissociations réversibles se produisent dans l' histone totale, il est légitime de calculer pour chacun de ces groupes une mobilité moyenne, en additionnant les mobilités de chaque constituant, en tenant compte de leurs taux respectifs.

Dans le Tableau I, on voit que le groupe I, par exemple, renferme à pH 8,6 deux constituants de mobilités 9,9 et 8,5 dont les pourcentages respectifs sont 19 et 58%. La mobilité moyenne, calculée pour le groupe sera :

$$\frac{9,9 \times 19 + 8,5 \times 58}{77} = 8,8$$

Pour les courbes des Figures 10, 11, 12, les mobilités de chaque groupe ont été calculées de cette façon.

Etude de la courbe de la Figure 10 : Cette courbe montre que :

-- (a) Aux pH 4,7 et 11,0, les trois groupes ont la même mobilité, c'est-à-dire qu'on ne retrouve plus qu'un seul constituant, ce qu'avait d'ailleurs montré l'électrophorèse pour le pH 4,7; quant au point obtenu graphiquement pour pH 11,0, nous n'avons pu le vérifier expérimentalement, car la proximité du point isoélectrique provoque la précipitation de l'histone totale.

-- (b) Le point isoélectrique de l'histone totale, c'est-à-dire le point d'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses est situé pour chaque groupe entre 10,8 et 11,0. Le point isoélectrique déterminé par la méthode graphique est donc voisin de 11,0.

Des courbes analogues, faites pour les fractions A et B, ont donné les points isoélectriques respectifs de 10,9 et 11,1 (Fig. 11 et 12 et Tableaux IX et X).

TABLEAU IX

Mobilités électrophorétiques moyennes des différents constituants de la fraction A à plusieurs pH (tampons de Michaelis de force ionique 0, 1).

pH	groupe I		groupe II		groupe III	
4,7	93%	11,5			7%	9,5
6,8	69%	10,2	25%	9,0	6%	7,8
8,4	70%	9,0	23%	7,5	7%	5,8
12,0	78%	- 9,6	11%	- 6,5	11%	- 3,9

TABLEAU X

Mobilités électrophorétiques moyennes des différents constituants de la fraction B à plusieurs pH (tampons de Michaelis de force ionique 0, 1).

pH	groupe I		groupe II	
4,7	91%	11,0	9%	9,0
6,8	94%	9,4	6%	7,0
8,4	90%	7,7	10%	4,7
12,0	84%	- 12,2	16%	- 9,3

B. ULTRACENTRIFUGATIONS DE L'HISTONE TOTALE

L'ultracentrifugation permet dans certaines conditions de mettre en évidence l'hétérogénéité d'une substance. Nous avons voulu confirmer celle de l'histone totale de placenta humain, ainsi que certaines propriétés des fractions déjà révélées par électrophorèse.

Nous avons ainsi voulu voir si deux techniques qui font appel à des propriétés physico-chimiques différentes permettent de mettre en évidence, non seulement le même nombre de constituants, mais aussi l'association et la dissociation de l'histone totale en fonction du pH, ainsi que l'irréversibilité de la transformation de la fraction I en fraction II. La méthode d'ultracentrifugation appliquée à l'histone totale du thymus de veau montre que,si l'on extrait l'histone totale au moyen de HCl 0,2 N ou 0,1 N à partir de la nucléoprotéine (Hamer, 1951; Butler, 1954; Ui, 1957b) ou des noyaux isolés, il apparaît deux fractions appelées "lourde" et "légère". Mais si l'extraction est effectuée par H_2SO_4 0,1 N à partir de noyaux isolés (Cruft et coll., 1957a), il apparaît six constituants.

Résultats

L'histone totale du placenta humain, à une concentration de 1%, a été dialysée contre du tampon au véronal sodique à pH 4,8, 6,8 et 8,6. Les analyses ont été faites dans l'ultracentrifugeuse Spinco, modèle E, à dispositif optique Philpot Svenson (combinaison barre oblique, lentille cylindrique).

Nos résultats sont réunis dans le Tableau XI.

TABLEAU XI

Ultracentrifugation de l'histone totale à différents pH.
Concentration de l'histone 1%. Coefficient de sédimentation corrigé à 20°.

pH	4,8	6,8		8,6	
S_{20}	1,1	0,98	14,2	1,35	17,7
%	100	77	23	59	41

Le Tableau XI et la Figure 13 montrent qu'à pH 4,8, il apparaît un seul constituant qui a un coefficient de sédimentation S = 1,1. Dans

la littérature (Busch et coll., 1958b), cette valeur S = 1,1 est signalée pour la fraction "légère".

Par contre, si l'on augmente le pH, il apparaît à pH 6,8, 23% d'un constituant "lourd" de S_{20} = 14,2 et à pH 8,6, 41% d'un autre constituant de S_{20} = 17,7.

Pour montrer que l'apparition des différents constituants est fonction du pH, nous avons dialysé l'histone totale à pH 4,8 et 8,6, puis une deuxième fois à pH 6,8.

TABLEAU XII

Ultracentrifugation de l'histone totale après deux dialyses successives à pH différents. Concentration de l'histone 1%. Coefficient de sédimentation corrigé à 20°.

1ère dialyse	6,8		4,8		8,6	
2ème dialyse	6,8		6,8		6,8	
S_{20}	0,98	14,2	1,47	8	0,98	18
%	77	23	66,5	33,5	87	13

Conditions expérimentales : voir page 49.

Dans le Tableau XII, bien que les valeurs du coefficient de sédimentation ne soient pas identiques aux différents pH, on observe que la solution d'histone, d'abord dialysée à pH 4,8, puis à pH 6,8, présente, après la deuxième dialyse, un constituant "lourd" qui n'existe pas à pH 4,8. D'autre part, si la solution d'histone est dialysée successivement à pH 8,6 et à pH 6,8, le constituant "lourd" est toujours présent.

Etant donné que la fraction I présente des propriétés particulières à l'électrophorèse (Fig.9), nous avons voulu voir si elle se comportait aussi d'une façon différente de la fraction II à l'ultracentrifugation.

FIGURE 13

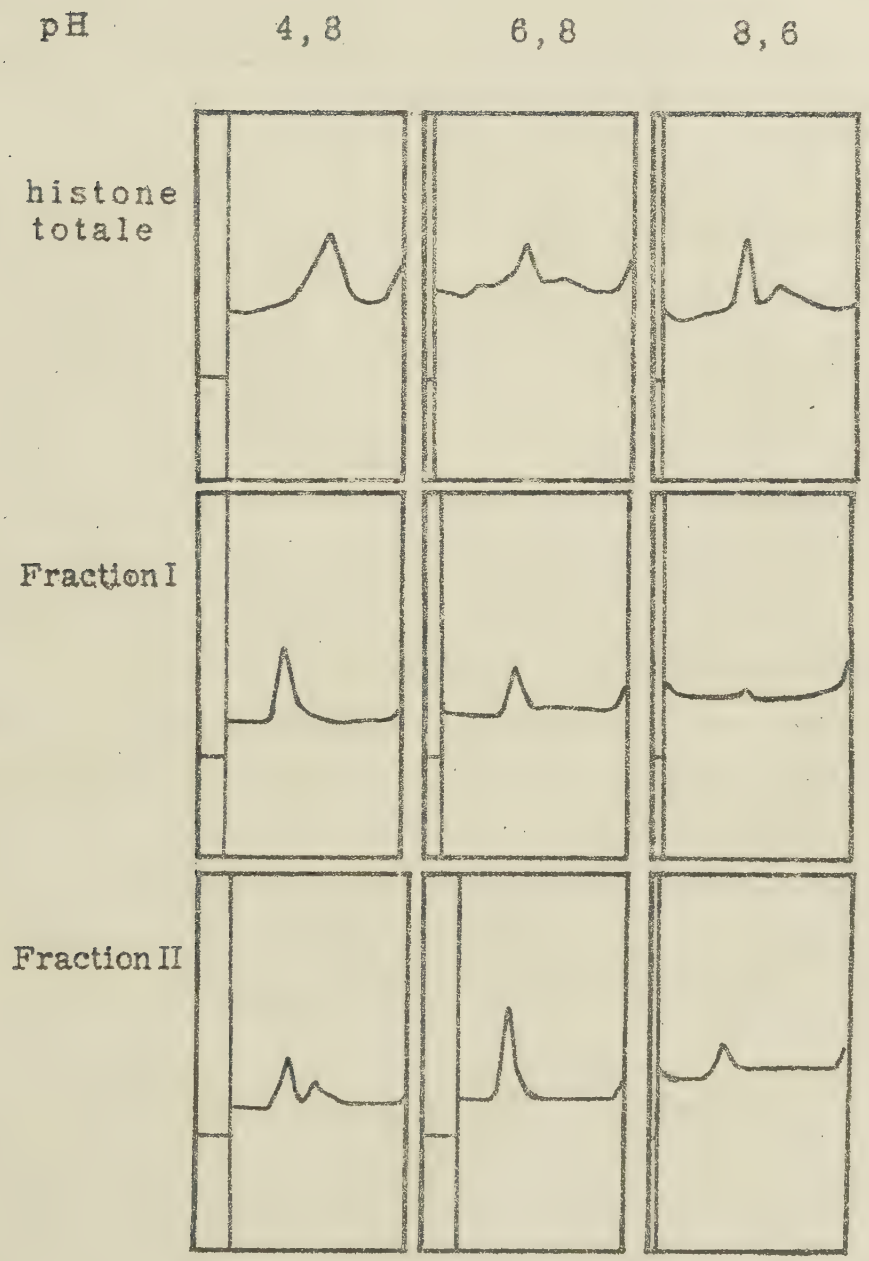


Diagramme d'ultracentrifugation de l'histone totale et des Fractions I et II à différents pH.

Tampon utilisé : véronal sodique, force ionique 0,1
Vitesse de centrifugation : 59.780 rpm.

Les conditions expérimentales sont décrites page 49.

Nous avons donc dialysé les fractions I et II contre le tampon au véronal à différents pH (4,8, 6,8 et 8,6), avant de les soumettre à l'ultracentrifugation.

Dans le Tableau XIII et la Figure 13, sont résumés les résultats fournis par l'ultracentrifugation des fractions I et II à différents pH.

TABLEAU XIII

Ultracentrifugation des fractions I et II à différents pH

pH	4,8	6,8	8,6
S fraction I	1,23	1,63	2,4
%	100	100	100
S fraction II	1,65	1,65	1,62 - 6
%			58 - 42

La fraction I s'agrège en fonction du pH (S augmente avec le pH), tandis que dans la fraction II, on trouve un constituant dont S reste constant en fonction du pH. Cependant, à pH 8,6, il apparaît un produit d'agrégation de S = 6. Il est possible qu'il corresponde à une agrégation partielle de la fraction II.

TABLEAU XIV

Ultracentrifugation des fractions I et II conservées dans HCl 0,2 N à 4°C pendant une semaine

	Fraction I		Fraction I après 1 sem. à 4°C	Fraction II	Fraction II après 1 sem. à 4°C
S	0.7	6.1	2.4	2.4	2.8
%	78	22	100	100	100

D'autre part, nous avons observé (Tableau XIV) que,si l'on conserve en solution HCl les fraction I et II pendant une semaine à 4°C, la constante de sédimentation de la fraction I devient égale à celle de la fraction II. Ce résultat est à rapprocher de celui fourni par l'électrophorèse (Tableau VIII). qui montre la similitude des mobilités de ces deux fractions, après un séjour prolongé à 4°C.

Conclusion

Les résultats de l'ultracentrifugation montrent que,dans l'histone totale du placenta humain,existent deux constituants "lourd" et léger". Quand on fractionne l'histone par précipitation à différents pH, on observe que la fraction I a la propriété de s'agréger plus facilement que la fraction II.

Les expériences d'ultracentrifugation confirment donc les résultats que nous avons obtenus par l'électrophorèse :

- a) l'histone totale s'agrège en fonction du pH.
- b) la fraction I s'agrège à pH neutre et alcalin, tandis que seulement une partie de la fraction II s'agrège à pH alcalin.
- c) par conservation prolongée à 4°C, la fraction I acquiert des propriétés de sédimentation semblables à celles de la fraction II qui, dans les mêmes conditions,est caractérisée par sa stabilité.
- d) on retrouve par ultracentrifugation les trois groupes d'histone déjà décelés par électrophorèse.

oooooooooo

Chapitre III

COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HISTONE TOTALE ET DE SES FRACTIO

Les méthodes d'analyse physico-chimique décrites dans le Chapitre II ont démontré l'hétérogénéité de l'histone extraite du placenta humain et des fractions qu'on peut en séparer.

En étudiant la composition chimique de ces fractions, nous avons cherché à tirer des arguments complémentaires et décisifs sur l'hétérogénéité mise en évidence au Chapitre II. En outre, l'analyse chimique pouvait nous apporter des renseignements sur la spécificité tissulaire des histones.

A. COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Nous avons déterminé les acides aminés totaux et les acides aminés N-terminaux selon la méthode de Sanger (1945), modifiée par Phillips(1958).

1) Dosage des acides aminés totaux

a) Dans un tube scellé, on hydrolyse 10 mg de protéine par 0,3 ml de HCl 6 N, à 120°, pendant 18 heures. On élimine HCl par évaporation sous vide, en présence de NaOH. On reprend le résidu par 1 ml d'eau et on neutralise avec $KHCO_3$ jusqu'à pH 9.

b) Réaction avec le fluorodinitrobenzène (FDNB). A 1 ml d'hydrolysat à pH 9, on ajoute 1,8 ml d'une solution de FDNB à 5% dans l'alcool à 96°. On agite 16 heures à l'obscurité. Pour enlever l'excès de FDNB, on agite, à trois reprises, avec un mélange d'acétone-éther et on décante les liquides de lavage, puis on acidifie avec HCl concentré jusqu'à pH 2, pour précipiter le mélange des DNP-acides aminés acido-insolubles.

Une partie des complexes DNP-acides aminés est soluble dans l'éther. L'autre est soluble en milieu aqueux acide; par cette

différence de solubilité, on sépare le mélange des acides aminés complexés en deux fractions : acido-soluble et éthéro-soluble . Le précipité qui se trouve en milieu aqueux acide (pH 2) est lavé trois fois par l'éther; on obtient ainsi la fraction éthéro-soluble. Les DNP-acides aminés solubles à pH 2 constituent la fraction acido-soluble.

c) Analyse chromatographique :

1 - Fraction éthéro-soluble. Dans cette fraction, on trouve tous les acides aminés, sauf l'histidine et l'arginine.

Pour séparer les DNP-acides aminés éthéro-solubles, on fait une chromatographie bi-dimensionnelle sur papier Whatman n°7, lavé au tampon phtalate à pH 6,0, en employant en premier lieu comme solvant, le mélange butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) ("première dimension") et le tampon phosphate 1,5 M pH 6 pour la deuxième opération ("deuxième dimension").

2 - Fraction acido-soluble. Pour séparer l'histidine de l'arginine, on évapore le résidu acido-soluble. On reprend par 1 ml d'acétone et on fait une chromatographie sur papier Whatman n°1, en employant comme solvant le mélange butanol-acide acétique-eau (4:1:5).

Toutes les chromatographies sont faites à l'abri de la lumière, pour éviter la décomposition des dérivés DNP-acides aminés. Les taches sont éluées par 3 ml de $NaHCO_3$ à 1%, en chauffant 20 minutes à 50° au bain-marie. On amène à 5 ml et on mesure l'absorption à 360 mμ, sauf pour la proline à 365 mμ, avec le spectrophotomètre Unicam. A partir de la densité optique, on calcule la concentration en millimoles des acides aminés, en la multipliant par un facteur particulier pour chaque acide aminé (indiqué par Biserte et coll., 1959).

2) Dosage des acides aminés N-terminaux

a) Réaction de la protéine avec le fluorodinitrobenzène (FDNB). On traite 20 mg de protéine, dissoute dans 1 ml d'eau et amenée à pH 9 par 10 à 15 mg de $KHCO_3$, par une solution alcoolique de FDNB à 5%. On agite 16 à 20 heures. Après acidification, on dilue, puis on extrait la DNP-protéine par de l'éther. On obtient ainsi une poudre jaune (120% du poids de protéine traitée) qu'on lave avec HCl N, puis avec de l'acétone et de l'éther.

b) On hydrolyse la DNP-protéine par 1,5 ml de HCl 11,5 N en tube scellé, 4 à 5 heures, à 100°.

c) A partir de l'hydrolysat dilué, on isole, par quatre extractions à l'éther, les dérivés DNP-acides aminés N-terminaux, que l'on sépare ensuite par chromatographie sur papier, selon la méthode décrite pour le dosage des acides aminés totaux.

3) Résultats

Dans les tableaux suivants, nous résumerons la composition en acides aminés et en groupes N-terminaux de l'histone totale de placenta humain et de ses fractions, ainsi que celle des histones d'autres origines.

Dans le Tableau XV, on trouve la composition de l'histone totale de différentes origines. Ces histones sont plus riches en lysine qu'en arginine. Elles contiennent les principaux acides aminés que l'on trouve dans les protéines, à l'exception du tryptophane et des acides aminés soufrés. Les résultats sont exprimés en moles/100 moles d'acides aminés totaux (Crampton et coll., 1955; Phillips et Johns, 1959a; Klyszejko et Khouvine, 1960). Nous avons adopté aussi cette façon d'exprimer les résultats, pour faciliter la comparaison avec la composition obtenue par ces auteurs. Si l'on compare la composition de l'histone du placenta avec celle de l'histone totale d'autres

TABLEAU XV

Composition d'histones de différents tissus

	Placenta humain	Thymus de veau		Pancréas de jeune boeuf	Epithéliome T8 de rat	Adénocarcinome humain de mamelle
	(Hirschbein)	(Crampton et coll.)	(Phillips et Johns)	(Klyszjeko Khouvine)	(Khouvine Grégoire)	(Khouvine et Zalta)
arginine	10,3	9,3	9,2	6,5	18	10
lysine	13,0	14,1	15,6	14,3	8	9
histidine	1,6	1,9	2	1,9	2,5	3
ac.glutamique	13,5	8,0	14,2	9,7	2	5
ac.aspartique		4,8		5,5	7	3
sérine	5,9	5,2	5,2	4,8	2,5	5
glycocolle	8,1	8,9	8,5	5,7	14	16
thréonine	5,4	5,8	5,8	4,9	6,5	3,5
alanine	15,4	13,1	13,8	13,9	6	8
tyrosine	1,1	2,6	1,7	1,9	12	16
valine	19,5	6,4	6,4	8,1	8	4
leucine-isoleucine		8,2 4,5	10,6	14,0	6	9
phénylalanine	1,9	1,7	1,9	3,2	4	3
proline	5,9	4,8	5,1	5,5	1	2
cystine-cystéine	-	traces	-	-	traces	traces
tryptophane	-	-	-	traces	traces	traces

tissus, on constate que les histones provenant de tissus normaux ont en commun une teneur élevée en lysine, tandis que celles provenant de tissus cancéreux sont riches en arginine. De plus, l'histone du

placenta humain est proche, comme composition globale, des histones des tissus normaux déjà étudiés.

Dans le Tableau XVI sont résumées les compositions des fractions obtenues à pH 6,5 et pH 9,0, fractions que nous avons appelées respectivement I et II.

TABLEAU XVI

Composition des fractions d'histone I et II exprimée en moles/100 moles d'acides aminés totaux

acides aminés	Fraction I	Fraction II
arginine	9,6	7,1
histidine	1,7	1,2
lysine	7,1	15,0
acide aspartique	6,1	4,9
acide glutamique	11,7	9,3
valine	7,9	6,4
leucine	13,5	11,5
sérine	6,5	5,8
thréonine	6,4	5,4
glycocolle	9,3	8,9
alanine	14,0	16,7
phénylalanine	-	-
tyrosine	0,4	0,8
proline	5,9	6,8

Des résultats de ce tableau, on peut conclure que, par précipitation à ces deux pH, l'histone a été fractionnée en deux grands groupes : la fraction I, qui contient des protéines plus riches en arginine

qu'en lysine, et la fraction II,qui comprend des protéines nettement plus riches en lysine.

On retrouve donc, par précipitation à différents pH, les deux grands groupes d'histone signalés par Mirsky (1946), Khouvine et Grégoire (1950), Davison et coll. (1954a), Grégoire et Limozin (1954), Crampton et coll.(1955), Bijvoet (1957). Malgré les différences portant sur les méthodes de fractionnement utilisées, nous avons constaté, comme tous ces auteurs, que l'une des fractions est riche en arginine, l'autre en lysine.

La fraction I, qui précipite à pH 6,5 et qui correspond à 20% de l'histone totale, présente la propriété de se transformer en protéine précipitable à pH 9,0 (fraction II).

En effet, nous avons constaté que, après une semaine à la glacière, la solution de l'histone totale dans HCl 0,2 N ne précipite plus lorsque le pH est amené à 6,5, mais seulement à pH 9,0. La fraction I présente exactement le même phénomène, après conservation à la glacière dans HCl 0,2 N ; en outre, l'examen par ultracentrifugation et électrophorèse de sa solution ainsi traitée révèle les mêmes constantes que pour la fraction II.

Les résultats du Tableau XVII montrent que, par ce mode de fractionnement, on obtient aussi deux types d'histones : l'un (fraction A), riche en arginine et l'autre (fraction B) riche en lysine.

Mais par cette méthode, c'est l'histone riche en arginine qu'on obtient en plus grande quantité (60%) tandis que l'on n'obtient que 12% d'histone riche en lysine.

La différence essentielle entre les fractions A et B se trouve dans les différents taux d'arginine et de lysine.

Si l'on compare les quatre fractions I, II, A et B avec l'histone totale, on constate que les propriétés de la fraction II sont très

TABLEAU XVII

Composition des fractions obtenues par fractionnement sur colonne de CMC

acides aminés	A %	B %
arginine	12,8	7,1
histidine	2,5	0,9
lysine	10,4	15,2
acide aspartique	5,0	9,5
acide glutamique	10,0	
valine	7,8	18,8
leucine	12,8	
sérine	5,3	4,6
thréonine	5,3	13,0
glycocolle	11,3	
alanine	11,9	13,9
tyrosine	0,9	2,5
proline	4,0	5,2
non identifié		9,2

Les résultats sont exprimés en moles/100moles d'acides aminés totaux.

semblables à celles de l'histone totale. Ceci résulte du fait que l'histone totale contient 4 fois plus de fraction II que de fraction I. Le fractionnement par chromatographie sur CMC conduit aussi à deux fractions dont les compositions sont à la fois différentes entre elles et différentes de celle de l'histone totale.

Nous avons donc pu séparer, par deux méthodes, une histone riche en lysine (B et II) et une riche en arginine (A et I) à partir d'une

histone riche en lysine (histone totale), mais leur composition en acides aminés et leur proportion dans l'histone totale varient selon le mode opératoire.

Nous avons enfin comparé les proportions d'acides aminés dibasiques et dicarboxyliques de chacune des histones que nous avons isolées et calculé leur rapport, comme on le voit dans le Tableau XVIII, où les résultats sont exprimés en rapports molaires.

TABLEAU XVIII

Rapports molaires : acides aminés basiques/acides aminés dans l'histone totale du placenta humain et dans ses fractions.

	histone totale	I	II	A	B
acides aminés basiques	24,5	18,4	23,3	25,7	22,4
acides glutamique et aspartique	13	17,8	14,2	12,9	9,06
Rapport : $\frac{\text{a.a.basiques}}{\text{a.a.acides}}$	1,88	1,03	1,64	1,99	2,47

I et II : Fractions obtenues par précipitation à pH 6,5 et 9,0

A et B : Fractions obtenues par chromatographie sur carboxyméthylcellulose et élution par HCl 0,01 N et 0,02N

D'après le Tableau XVIII, on constate que les rapports molaires entre acides aminés dibasiques et dicarboxyliques pour l'histone totale et les fractions A et II sont très voisins, de 1,84 environ. Pour la fraction B, le rapport est égal à 2,5. Quant à la fraction I, elle est très différente des autres, car le rapport est environ 1 et les pourcentages de moles d'acides aminés basiques sont inférieurs aux autres

(18,4%). Pour l'histone totale, les fractions II, A et B, ces pourcentages sont environ de 25% (Tableau XIX).

TABLEAU XIX

Pourcentages molaires d'acides aminés basiques dans les différentes fractions

	histone totale	placenta humain				thymus de veau (Phillips et Johns)	
		I	II	A	B	A'	B'
arginine	10,3	9,6	7,1	12,8	7,0	7,9	10,0
lysine	13,0	7,1	15,0	10,3	15,2	17,1	15,4
histidine	1,6	1,7	1,2	2,5	0,9	1,0	1,1
total	24,9	18,4	23,3	25,6	23,1	26,0	26,5

Nous avons donc isolé une fraction qui, bien qu'appartenant à l'histone totale, ne possède pas les principales caractéristiques des histones qui sont : une teneur en acides aminés basiques de 25% et un rapport acides aminés dibasiques/acides aminés dicarboxyliques d'environ 2.

B. GROUPES N-TERMINAUX

Comme le dosage des groupes N-terminaux peut également rendre compte de l'hétérogénéité d'une protéine, nous avons effectué les dosages de ces groupes dans l'histone totale et dans chacune des fractions. De plus, ils pourraient nous aider à identifier les groupes et à montrer que les quatre protéines sont différentes.

Dans le Tableau XX, nous avons consigné les dosages des groupes N-terminaux des histones totales du placenta et d'autres tissus. Toutes ces histones contiennent les mêmes pourcentages de proline et d'alanine comme groupes N-terminaux. La proportion des autres acides

aminés est plus faible. Apparemment donc, l'histone totale du placenta humain ne paraît pas plus complexe que les histones des autres tissus.

TABLEAU XX

Groupes N-terminaux de l'histone totale de placenta humain et des histones de différentes origines

Origine	Proline	Alanine	Valine-leucine	Autres groupes terminaux
placenta humain	45	17	4 - 5	34*
histone de thymus (1)	42	30	5	23
la même après dialyse (2)	35	27	8	30
histone de tumeur Walker de rat (1')	32	26	9	33

*34% correspond à la lysine, le glycocolle, la leucine et la valine

(1) et (1') Phillips et Simpson (résultats non publiés)

(2) Phillips (1957-1958)

Les résultats sont exprimés en % des groupes N-terminaux trouvés.

Le Tableau XXI montre que l'histone de placenta est plus complexe que celle de thymus, fractionnée par la même méthode. En effet, le fractionnement chromatographique nous conduit à deux grands groupes dont chacun contient au moins deux histones. La fraction A est riche en alanine et en proline, tandis que la fraction B est riche en leucine et en valine, le total de ces deux derniers acides aminés étant de 87%.

TABLEAU XXI

Groupes N-terminaux des fractions de l'histone de placenta humain

acides aminés	I	II	A	B
histidine	1,9	1,1	0,9	0
lysine	3,7	5,5		
acides aspartique) et glutamique)	2,7	3,7	7,3	
leucine	(	(	(	50
valine	(6,2	(8,4	(15,6	37
sérine	7,0	1,8	0	1
thréonine	5,8	7,1	3,7	4
glycocolle	3,7	3,7	0,9	0
alanine	26,4	27,1	34	0
tyrosine	0,4	0,7	0	3
proline	42,1	41,7	30	3

I et II : Fractions obtenues par précipitation à pH 6,5 et 9,0
A et B : Fractions obtenues par chromatographie sur carboxyméthylcellulose et élution par HCl 0,01 N et 0,02N

Les résultats sont exprimés en % des groupes N-terminaux trouvés.

Tous les auteurs qui ont dosé les groupes N-terminaux dans les fractions qu'ils ont obtenues, n'ont jamais constaté l'existence d'autres acides aminés N-terminaux que la proline et l'alanine, sauf Luck (1958) qui signale une fraction, séparée par chromatographie sur Amberlite IRC-50 et élution avec du chlorure de guanidinium qui contient comme groupes N-terminaux sturtout la valine et la valyl-lysine.

Quant aux groupes N-terminaux de la fraction I et II, les deux acides prédominants sont l'alanine et la proline, qui sont aussi

les deux acides aminés prédominants obtenus dans l'histone totale.

C. DISCUSSION

La comparaison des pourcentages molaires des acides aminés basiques dans différentes histones (Tableau XXII) permet de constater que les histones totales du thymus de veau (Crampton, 1957; Phillips, 1959a), du placenta humain et du pancréas de veau (Klyszejko et coll., 1960) contiennent toutes les mêmes proportions d'acides aminés basiques, soit 25%. Il est possible que ce taux caractérise les histones des tissus normaux. Cependant, à côté de ce type d'histones, on trouve dans le placenta un faible pourcentage d'autres protéines solubles dans HCl 0,2 N, mais qui, par alcalinisation, précipitent à pH 6,5 (fraction I) et dont la teneur en acides aminés basiques n'est que de 18%.

TABLEAU XXII

	Thymus de veau (Crampton Butler)		Pancréas de veau (Klyszejko)	Placenta humain (Hirschbein)
arginine	8,4	9,5	6,5	10,3
histidine	2,0	1,2	1,3	1,6
lysine	14,9	16,6	14,3	13,0
total	25,3	27,3	22,1	24,9

D'autre part, si l'on calcule le rapport entre les acides aminés basiques et les acides aminés dicarboxyliques, on constate qu'il est égal à 1 pour cette même fraction I, alors que, pour les autres fractions, ce rapport oscille entre 1,8 et 2,5.

De plus, cette fraction I ne peut plus être obtenue, si l'histone totale est conservée une semaine à 4°C en solution HCl 0,2 N; dans

ces conditions, la totalité de la protéine précipite à pH 9,0.

Tout se passe donc comme si l'histone précipitant à pH 6,5 (I) avait la propriété de former des agrégats qui ont la même constante de sédimentation et le même point isoélectrique que l'histone précipitant à pH 9,0 (II). Il se pourrait que cette agrégation se fasse par l'intermédiaire des acides aminés N-terminaux et le groupe carboxylique des acides aminés dicarboxyliques, ce qui a pour effet d'augmenter le nombre relatif des groupes chargés positivement et rend compte de l'élévation du point isoélectrique.

Monty (1959) a également observé la transformation irréversible, en solution saline, d'une fraction d'histone en une autre. En tenant compte du fait que les histones II, A et B contiennent 25% d'acides aminés basiques, on peut se demander si la fraction I fait partie du groupe des histones.

Cruft et coll. (1954, 1957a, 1957b) et Davison (1954b) ont observé que les histones des tissus néoplasiques diffèrent de celles des tissus homologues normaux en ce que des fractions de point isoélectrique voisin de 7 peuvent en être séparées. Mais Ui (1956) et Klyszejko et coll.(1960) ont trouvé ces protéines dans des cellules de tissus normaux, comme le thymus de veau et le pancréas de jeune boeuf. Il est possible qu'elles représentent un intermédiaire reliant les globulines résiduelles, qui restent attachées à l'ADN, et les histones. Donc, nous pouvons raisonnablement admettre que la fraction I représente une protéine qui n'est pas une histone. Bien que les deux fractions I et II aient des mobilités électrophorétiques différentes, elles paraissent homogènes à l'électrophorèse dans certaines conditions. Seule l'analyse des groupes N-terminaux a pu confirmer leur hétérogénéité. Tandis que les fractions A et B, qui ont les mêmes comportements à l'électrophorèse (ce qui tient probablement à leur teneur semblable en acides

aminés dicarboxyliques), présentent des groupes N-terminaux différents : l'alanine et la proline dans la fraction A, la valine et la leucine dans la fraction B.

Les méthodes de fractionnement utilisées nous conduisent à l'obtention de fractions, elles-mêmes hétérogènes. La composition de ces fractions rappelle ce qu'ont obtenu d'autres auteurs qui avaient utilisé des méthodes de fractionnement chimiques ou physico-chimiques différant des nôtres (cf. chapitre I). En effet, nos fractions I et B ont une composition en acides aminés voisine de celle d'une fraction riche en lysine obtenue par Crampton (1955, fraction 3) par Cruft (1957a, fraction 1,65) et par Butler (1959, fraction A'). Quant à notre fraction A, elle ressemble à la fraction de Cruft (1957a) et à la fraction "fast" de Davison et Butler (1954b).

Cependant, l'analyse des groupes N-terminaux montre que nos fractions sont plus complexes que celles étudiées jusqu'à présent, bien que nous les ayons obtenues par les mêmes méthodes de fractionnement. Si l'on tient compte des résultats du Tableau XXI (p. 64), nous pouvons affirmer que nous avons trouvé au moins six histones dans le placenta humain.

Nous discuterons la signification de ces résultats pour la spécificité des histones à la fin du présent chapitre.

D'autre part, nous voulons encore faire remarquer que nos deux méthodes de fractionnement séparent l'histone totale en deux grands groupes et que l'on trouve toujours, sauf dans la fraction I, un acide aminé basique pour trois acides aminés non basiques. On pourrait supposer qu'il existe dans l'histone totale du placenta humain des "unités" où la succession des acides aminés serait également -B-A-A-A-B-A, comme l'a supposé Butler en 1959.

D. LIPIDES

Nous avons décrit dans le chapitre II le fractionnement de l'histone totale par chromatographie sur colonne de carboxyméthylcellulose, selon la méthode de Phillips et Johns (1959a).

Une première fraction (fraction A) est obtenue en éluant par HCl 0,01 N, une seconde fraction (fraction B) en éluant par HCl 0,02 N.

Or, comme on ne récupère dans les éluats que 77% de l'histone totale adsorbée, nous avons voulu déterminer la nature de la fraction non éluable.

1°) Il ne s'agit pas d'une fraction relativement plus basique. En effet, le passage sur la colonne d'HCl plus concentré que 0,02 N ne parvient pas à éluer quoi que ce soit.

2°) Nous avons été amené à nous demander si l'histone totale contenait des lipoprotéides : l'étude du désoxyribonucléoprotéide, extrait du placenta humain avec NaCl . 10%, par diffraction des rayons X suggère la présence de lipides. Le diagramme de la Figure 14 rappelle celui obtenu par Luzzati et Nicolaieff (1959) avec la DNH (désoxyribonucléohistone) d'érythrocytes de poulet. Il présente des bandes parallèles et équidistantes qui traduisent, selon Wilkins (1959a), l'existence d'une phase lipidique liée à l'histone. Pourtant, Luzzati et Nicolaieff excluent cette possibilité. Cependant, l'interprétation de Wilkins a retenu notre attention et nous a poussée à chercher à mettre en évidence la présence de lipides dans notre préparation.

Nous avons pu montrer par des analyses qualitatives et quantitatives que des lipides, probablement non combinés à des protéines, restent adsorbés sur la colonne, qu'ils résistent aux moyens d'élution ordinaires et que l'histone totale contient un lipoprotéide.

FIGURE 14

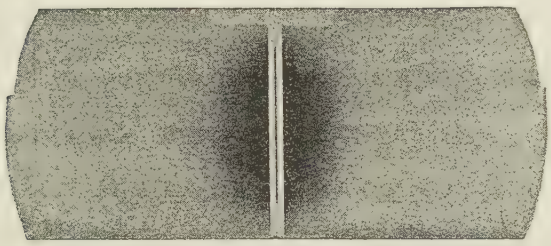


Diagramme aux rayons-X d'un gel de désoxynucléoprotéides de placenta humain
c = 33% dans l'eau salée (NaCl 0, 15 M)

1) Recherche qualitative

Le passage sur la colonne de solvants organiques (acétone, benzène, éther) qui auraient pu entraîner des lipides, n'a pas donné de réponse positive. Nous avons alors procédé à l'électrophorèse sur papier de l'histone totale et de ses fractions. L'électrophorèse a été effectuée dans un tampon acétate 0,02 M à pH 5, à 270 volts pendant 3 heures dans l'appareil Jouan, suivie de la révélation des lipides par le noir de Soudan (Swahn, 1952) et des protéines par le bleu de bromothymol (Durrum, 1950).

Résultats : Pour l'histone totale, nous avons constaté qu'une partie des lipides reste à l'emplacement de la tache de départ et qu'une autre partie a la même mobilité que les protéines. Avec la fraction B éluée par HCl 0,02 N, il n'y a pas de lipide restant sur la tache de départ, tous les lipides présents se superposant aux protéines. Quant à la fraction A, éluée par HCl 0,01 N, elle ne contient pas de lipides décelables.

2) Recherche quantitative

Le dosage des lipides contenus dans l'histone totale et les fractions A et B a été effectué selon la méthode de Rouget et coll. (1958) décrite page 13 .

TABLEAU XXV

	Quantité de substance utilisée (mg)	Total de lipides trouvés (µg)	%
histone totale	11,5	76,5	0,67
Fraction A	28	52	0,19
Fraction B	16	111	0,70

Si, à partir des résultats consignés dans le Tableau XXV, nous cherchons à établir le bilan des lipides au cours de la chromatographie sur colonne de carboxyméthylcellulose, nous voyons que pour 100 mg d'histone totale adsorbée, il y a 670 µg de lipides. On récupère 65 mg de la fraction A contenant 121 µg de lipides et 12 mg de la fraction B, contenant 83 µg de lipides. Ce qui fait que pour un rendement en protéines de 77%, celui en lipides n'est que de 30%.

3) Discussion

Il ressort de ces expériences que, dans l'histone totale du placenta humain, on trouve deux types de lipides : l'un formé de lipides libres, qui s'adsorbent irréversiblement sur une colonne de carboxyméthylcellulose, et qui ne migrent pas, dans nos conditions expérimentales, lors de l'électrophorèse sur papier; l'autre, lié à la fraction B. Cette dernière fraction correspond sans doute à un lipoprotéide*; celui-ci ne ressemblerait guère aux lipoprotéides nucléaires antérieurement décrits. En effet, les seuls lipoprotéides connus dans les noyaux sont ceux trouvés par Wang et coll. (1950), Dallam et coll.(1953), Mazia et coll.(1952), Meyer (1942), Engbring (1953). Tous ces auteurs mentionnent un lipoprotéide riche en acides aminés soufrés, contenant du tryptophane, de point isoélectrique environ 5,0, et extractible en milieu alcalin. Ces propriétés sont diamétralement opposées à celles du lipoprotéide que nous avons trouvé. En général, ces auteurs assimilent leur lipoprotéide à la protéine "résiduelle" décrite par Mirsky (1946) ou à la "chromosomine" de Stedman (1944).

---

* La recherche du phosphore par la méthode de Delsal qui permet de doser un minimum de 2 γ a été négative. Cependant le résultat n'exclut pas la présence d'un phospholipoprotéide, puisque la petite quantité de phosphore qu'il apporterait ne pourrait être décelée chimiquement.

Seul Monty (1959) décrit un lipoprotéide, extrait du noyau de foie de rat, dont la composition en acides aminés est semblable à celle d'une fraction d'histone. Bien qu'il n'affirme pas qu'il s'agisse d'une "lipohistone", il remarque qu'elle présente une basicité plus élevée que la protéine résiduelle et qu'elle n'est pas extractible au moyen de solutions alcalines.

D'autre part, nos résultats analytiques viennent à l'appui de l'interprétation de Wilkins (1959b), à qui les diagrammes de rayons X des désoxyribonucléoprotéides de thymus de veau suggèrent la présence de lipides liés aux histones. On pourrait peut-être leur attribuer la cohésion des structures nucléoprotéiques.

E. CONCLUSION

Les analyses chimiques ont confirmé les résultats que nous avaient fournis l'électrophorèse et l'ultracentrifugation. L'histone totale du placenta est formée de plusieurs protéines. Bien que nos techniques de fractionnement diffèrent de celles utilisées par les auteurs qui, avant nous, avaient étudié d'autres tissus, chacune des fractions que nous avons obtenues est comparable à une fraction antérieurement décrite. Par contre, la même méthode de fractionnement appliquée à différents tissus, donne des résultats différents; ceci est particulièrement évident pour l'analyse des groupes N-terminaux. Ces considérations nous amènent à admettre qu'il existe entre les diverses histones étudiées jusqu'à présent des différences et aussi des similitudes, dont la connaissance est insuffisante à l'heure actuelle pour conclure qu'il y a ou non une spécificité quelconque.

D'autre part, l'argument que des histones dont le point isoélectrique est voisin de 7,0 seraient spécifiques de tissus

néoplasiques (Cruft et Davison), semble, d'après nos travaux, s'avérer faux, car le placenta humain,ainsi que le pancréas de jeune boeuf,contiennent également de telles protéines.

En outre, nous avons trouvé dans l'histone totale du placenta humain, un lipoprotéide dont la composition en groupes aminés N-terminaux ne correspond à aucune des fractions décrites jusqu'à présent. C'est, à notre connaissance, la première fois que l'existence d'une "lipo histone" est démontrée.

oooooooo

Deuxième partie

ETUDE SUR LA FONCTION DES HISTONES DANS LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Chapitre IV

FONCTION METABOLIQUE DES HISTONES

A. INTRODUCTION

Dans les chapitres précédents, nous avons étudié les propriétés chimiques et physico-chimiques des histones du placenta humain, afin d'en déceler une spécificité de tissu ou d'espèce.

Dans le présent chapitre, nous avons voulu préciser le rôle physiologique de ces histones. Leur localisation dans le noyau cellulaire nous a conduite à isoler les noyaux de placenta et à en extraire les histones; nous avons ensuite étudié l'incorporation des acides aminés marqués dans ces histones et leur action sur cette incorporation dans diverses fractions nucléaires.

Avant d'exposer les résultats de nos expériences sur l'incorporation des acides aminés marqués dans les histones, nous résumerons brièvement quelques méthodes d'isolement des noyaux, nous rapporterons certains résultats portant sur cette incorporation dans des tissus autres que le placenta, et nous discuterons le rôle actuellement attribué aux histones dans le noyau.

Méthodes d'isolement des noyaux

C'est Miescher qui le premier, en 1897, a isolé des noyaux de cellules de pus, après digestion pepsique du cytoplasme. Depuis, d'autres procédés ont été proposés qui, en général, mettent à profit la plus forte densité des noyaux par rapport aux particules cytoplasmiques. Mais ces méthodes sont d'un emploi délicat. L'isolement des noyaux dits "purs" se fait souvent au détriment de leurs propriétés enzymatiques : l'homogénéisation des tissus dans des solutions aqueuses peut amener la perte d'enzymes solubles et l'emploi de solvants qui dissolvent les lipides peut modifier la perméabilité de la membrane nucléaire.

D'autre part, la purification doit être suffisamment poussée pour éviter la contamination des noyaux par des particules cytoplasmiques, ou par des fragments de cytoplasme encore attachés au noyau.

Comme la méthode de Miescher n'était pas applicable aux tissus généralement étudiés, Behrens (1932) a mis au point une nouvelle méthode. Après lyophilisation du tissu, les noyaux sont obtenus par centrifugation fractionnée dans une série de mélanges de benzène et de tétrachlorure de carbone. Les modifications que cette technique apporterait à l'activité enzymatique sont discutables. Allfrey qui, en 1953, avait observé la disparition de l'activité de l'aldolase, revient sur ce résultat en 1957 : il ne note pas de différence quant aux teneurs en ADN, protéines, ARN et enzymes entre noyaux de thymus de veau préparés selon la méthode de Behrens ou isolés par centrifugation dans du saccharose isotonique, méthode que nous verrons être la meilleure. Toutefois, la méthode de Behrens altère l'aspect morphologique des noyaux, ce qui a amené le rejet de l'utilisation de solvants organiques.

Ainsi, Dounce (1950) a homogénéisé le tissu dans un tampon citrate à pH 6,0. Mais le rapport ADN/protéine est inférieur à celui que l'on obtient par la méthode de Behrens.

Ce n'est que par l'utilisation de solutions isotoniques de saccharose que l'on a isolé des noyaux non agglutinés, morphologiquement normaux. Hogeboom (1952) a été le premier à utiliser les solutions isotoniques de saccharose. Il isole les noyaux après avoir homogénéisé le tissu dans une solution de saccharose 0,25 M qui contient Ca^{++} 2×10^{-4}M. Il abaisse ainsi le taux de mitochondries des préparations nucléaires à 0,5%.

Enfin, nous citerons la méthode de Chauveau (1956) qui lui a permis d'obtenir des noyaux très propres dans une solution de

saccharose 2,2 M, en centrifugeant 1 heure à 40.000 g, avec la centrifugeuse Spinco préparative. Moulé et Chauveau (1959) ont vérifié par des méthodes enzymatiques le degré de contamination très faible par des particules cytoplasmiques.

Synthèse des protéines dans les noyaux

Depuis les travaux de Caspersson (1941) et de Brachet (1941) sur la localisation des acides nucléiques, de Jeener et Szafarz (1950) et de Marshak et Calvet (1949) sur leur activité métabolique, on admet que le noyau est le siège de synthèse d'ARN, d'ADN et des corps qui en dérivent. Le rôle de l'ARN dans la synthèse des protéines semble acquis (Hoagland, 1960), celui de l'ADN, dans cette même synthèse a, jusqu'ici, été interprété comme une action indirecte avec, comme intermédiaire, la synthèse de l'ARN (Weiss, 1961, Ochoa, 1961, Hurwitz, 1960, Furth, 1961). Le noyau peut-il, à lui seul, sans le secours du cytoplasme, assurer une synthèse des protéines ?

Cette question a amené certains auteurs à étudier l'incorporation d'acides aminés libres dans les noyaux .

Daly (1952), Smellie et coll. (1953), ont injecté à des rats des acides aminés marqués, en particulier du glycocolle, puis ils ont isolé les cellules du foie et ont mesuré le taux d'incorporation de l'isotope dans différentes fractions cellulaires.

L'incorporation la plus grande a lieu dans les microsomes, la plus faible dans les protéines nucléaires; l'histone n'incorpore pratiquement pas d'acides aminés marqués. La protéine résiduelle , fortement attachée à l'ADN est, au contraire, la protéine marquée. Cependant, ces expériences ne prouvent pas que les noyaux sont, à eux seuls, capables de synthétiser les protéines.

Mais en 1957, Allfrey et coll. incubent en présence d'acides

aminés marqués des noyaux isolés de thymus de veau et étudient l'incorporation de l'isotope dans les différentes protéines nucléaires.

Ils constatent que les noyaux isolés incorporent les acides aminés marqués. Cette incorporation serait liée à des phénomènes producteurs d'énergie, comme les phosphorylations oxydatives, car les inhibiteurs des phosphorylations (cyanure, dinitrophénol, dicoumarol, antimycine) inhibent l'incorporation des acides aminés dans les protéines nucléaires. L'incorporation accrue des acides aminés dans les protéines s'accompagne d'une augmentation des nucléosidestriphosphates. Après fractionnement des protéines, ils montrent, enfin, que les histones sont relativement inertes, tandis que les protéines résiduelles liées à l'ADN ont un renouvellement très grand. A ces résultats, on a objecté que les noyaux pouvaient être contaminés par du cytoplasme. Ficq et Errera (1956) les ont confirmés par autoradiographie : les noyaus isolés sont effectivement capables d'incorporer les acides aminés dans leurs protéines.

En ce qui concerne l'incorporation dans les histones, nous devons citer encore les expériences de Rotherham en 1957 : vingt minutes après injection de glycocolle marqué à des rats normaux ou porteurs d'hépatome, la radioactivité spécifique de l'histone est deux fois plus importante dans la tumeur que dans le foie normal. On peut rapprocher ces résultats de ceux trouvés par Busch, Davis et Anderson (1958) : ces auteurs ont montré que, une heure après injection de ^{14}C-lysine à des rats normaux ou porteurs de la tumeur de Walker et Jensen, la radioactivité spécifique des histones dans les tumeurs est plus grande que celle des autres protéines nucléaires ou des autres fractions cellulaires (microsomes et surnageant).

L'ensemble de ces résultats montre donc que les noyaux sont effectivement capables d'assurer la synthèse de protéines, sans intervention du cytoplasme. Le renouvellement des protéines nucléaires

reste toutefois plus faible que celle des protéines cytoplasmiques. Dans les tissus normaux, l'histone est la moins marquée des protéines cellulaires. Dans les tissus néoplasiques, c'est au contraire l'histone qui incorpore les acides aminés le plus activement.

Rôle des histones

Il est difficile à l'heure actuelle, d'attribuer un rôle certain aux histones dans le noyau. Certaines hypothèses retiendront cependant notre attention.

Caspersson(1947) a émis une des premières théories sur le rôle probable des histones : il pense que les noyaux constituent le centre principal de la synthèse des protéines, l'euchromatine qui est riche en ADN synthétiserait des protéines complexes, tandis que l'hétérochromatine, au contraire, serait responsable de la synthèse des histones et de leur accumulation dans le nucléole. Les histones diffuseraient du nucléole dans le cytoplasme où elles induiraient la synthèse de l'ARN cytoplasmique et ce dernier provoquerait la synthèse des protéines cytoplasmiques. Des travaux postérieurs ont montré que l'hypothèse de Caspersson n'est pas juste en ce qui concerne le rôle important qu'elle attribue à l'histone (Brachet, 1952). En effet, il a été impossible de démontrer la présence de protéines basiques dans le nucléole de toute une série de noyaux. Cependant, il est intéressant de remarquer que des protéines basiques du type histone ont été trouvées dans les microsomes de foie de rat (Cohn, 1960) et dans les microsomes de pois en germination (T.'so,1958).

Par une série de travaux (Cruft, 1957), on a tenté de mettre en évidence les différences des propriétés chimiques ou physico-chimiques de diverses histones préparées à partir de différents tissus normaux et cancéreux. Ces différences, si elles étaient prouvées, permettraient de

penser qu'une partie de la spécificité tissulaire serait due à l'interaction inhibitrice de certaines histones et de certains gènes (Stedman et Stedman, 1951). Mais nous avons montré (voir chapitres précédents) qu'il est impossible, pour différents tissus d'animaux d'espèces différentes (foie de rat, thymus de veau, pancréas de jeune boeuf et placenta humain), de mettre en évidence des caractères chimiques distinctifs bien nets par les méthodes utilisées. L'étude des histones provenant de tissus normaux et de leurs homologues cancéreux a seulement permis la démonstration d'une certaine spécificité physico-chimique (agrégation plus ou moins importante selon le pH, points isoélectriques et mobilités électrophorétiques différentes) (Davidson, 1957).

On peut donc se demander si ces différences physico-chimiques sont suffisantes pour étayer l'hypothèse de Stedman. D'autant plus que ces différences tiennent peut-être à la diversité et à l'imperfection des modes de préparation.

Comme l'ADN, privé de ses histones, est capable de former in vitro des composés stables avec de nombreux enzymes, soit par l'intermédiaire de ses groupements chargés, soit par des liaisons hydrogènes , Butler (1959) croit que les histones ont, dans le noyau, la fonction importante d'empêcher d'autres protéines de se combiner avec l'ADN. D'autre part, Luzzati (1959) pense qu'elles forment avec l'ADN des complexes de structures bien définies. Ces structures seraient d'ailleurs nécessaires au métabolisme du noyau. Lorsqu'elles sont détruites par la désoxyribonucléase, par exemple, l'incorporation des acides aminés est inhibée. Mais, dans les complexes ADN-histones, Allfrey et Mirsky (1958) ont montré que l'ADN peut être remplacé par un polyanion et que l'incorporation a néanmoins lieu. Il semble donc que la présence d'un complexe polyanion - protéine basique soit nécessaire, dans le noyau, pour l'incorporation d'acides aminés dans

les protéines.

Monty (1959), se basant sur des études chimiques et physico-chimiques faites sur les histones de foie de rat, pense que ces protéines, non seulement neutraliseraient les fonctions acides de l'ADN, mais qu'elles interviendraient aussi au moment des mitoses en se polymérisant et en participant à la formation de lipoprotéides attachés à l'ADN.

Enfin, Allfrey et coll. (1957), par des expériences d'incorporation in vitro et in vivo sur les noyaux de foie de rat et de thymus de veau, montrent que les histones n'incorporent pratiquement pas d'acide aminé marqué.

On voit donc, par ces travaux, qu'on n'a pas réussi à démontrer un rôle physiologique défini pour les histones.

Néanmoins, nous avons pensé qu'il serait possible d'obtenir un résultat plus significatif : 1°) en utilisant comme précurseur marqué l'arginine, parce que celle-ci est un constituant caractéristique de la fraction d'histone qui est le plus fortement liée à l'ADN; 2°) en prolongeant les durées d'incubation, de façon à pouvoir observer une éventuelle incorporation, même très lente. Nous exposerons dans le présent chapitre les résultats que nous avons obtenus avec les noyaux isolés de placenta humain, sur l'activité métabolique des histones, et leur action sur les fractions de noyaux éclatés.

Techniques utilisées

Nous décrirons successivement la technique d'isolement des noyaux, l'extraction de leur histone totale et l'incorporation des acides aminés dans les noyaux.

B. ISOLEMENT DES NOYAUX DE PLACENTA HUMAIN

Nous avons d'abord tenté l'isolement des noyaux selon la méthode d'Allfrey et Mirsky (1957) et celle de Chauveau (1956).

Mais la première nous a donné des noyaux fortement

contaminés par des particules et des débris cytoplasmiques que nous n'avons pas réussi à éliminer. Par la méthode de Chauveau, nous avons obtenu des noyaux agglutinés, avec lesquels il nous a été impossible d'obtenir une bonne incorporation d'acides aminés. Il est à noter que cette agglutination n'a jamais été constatée pour les tissus de rat.

Un des obstacles essentiels que nous avons rencontré au cours de la préparation des noyaux de placenta est la présence d'érythrocytes. On peut les éliminer assez facilement par addition de digitonine dans les filtrats de l'homogénat; mais les noyaux ainsi obtenus incorporent moins bien les acides aminés que les témoins.

Finalement, nous avons employé une méthode de centrifugation fractionnée, dans un gradient discontinu de solutions de saccharose. Elle a été mise au point, dans notre laboratoire, par Sripati, pour la préparation des noyaux de l'épithéliome T 8 de Guérin.

Le Tableau XXVI montre qu'avec cette méthode on obtient une incorporation supérieure à celle que donnent les autres méthodes.

TABLEAU XXVI

Incorporation de l'arginine ^{14}C dans les noyaux de placenta isolés suivant différentes méthodes

	Méthode de Chauveau	0,5 o/oo bilirubine	1 o/oo digitonine	Méthode de Sripati
activ. spéc. (Coups/min/mg protéine)	65	86	47	280

Conditions d'incorporation voir : Milieu I page 84.
quantité de noyaux: 2 g de protéine par tube

Avant de décrire la méthode de préparation des noyaux, nous donnerons la composition des solutions utilisées pour les centrifugations

fractionnées :

Solution tampon à pH 7,2 :

KH_2PO_4	1,27 g	pour 1 litre de solution aqueuse
K_2HPO_4	2,11 g	
$NaHCO_3$	0,12 g	

Solutions de saccharose tamponnées :

Solution I -- saccharose = 0, 145 M dans le tampon ci-dessus

" II " 0,4 M "

" III " 0,8 M "

Le placenta est mis dans la glace, aussitôt après l'accouchement et, environ une demi-heure plus tard, il est perfusé à + 4°C, pendant 2 heures, avec 10 litres de solution de NaCl à 9 °/oo (toutes les opérations sont faites à froid, à +4°C). En général, le tiers du placenta seulement est bien perfusé. On le prélève (environ 100 g), on le coupe en petitsmorceaux qu'on met en suspension dans 2-3 fois leur poids de solution I et l'on broie avec le broyeur Ultra-Turrax, pendant 1 à 2 minutes, à la vitesse maximale de l'appareil. On filtre sur quatre épaisseurs d'étamine. On superpose dans les tubes coniques du centrifugeur Jouan n° 56, à 10 ml de la solution II, 5 ml de l'homogénat filtré. On centrifuge 2 à 3 minutes à 500 g; on obtient un culot de noyaux impurs et un liquide surnageant qui contient les débris cellulaires, les microsomes, la plupart des mitochondries et des érythrocytes.

Pour laver les noyaux, on les met en suspension dans la solution I et on superpose 5 ml de cette suspension à 10 ml de la solution III et on centrifuge 2 à 3 minutes à 500 g. Le culot de noyaux contient encore des hématies. On l'en débarrasse par deux nouveaux lavages faits comme le premier par homogénéisation avec le broyeur Turrax à 110 volts dans la solution I, mais par centrifugation sur la solution III. Ces noyaux sont conservés dans la glace.

L'efficacité des lavages est contrôlée par des examens au

microscope à contraste de phase. Après le dernier lavage, les préparations semblent pures. L'examen au microscope électronique montre que la pureté des noyaux ainsi préparés est de 95% et le rendement calculé sur la quantité d'acide désoxyribonucléique est de 10%.

Sur ces noyaux ainsi purifiés, nous avons dosé l'ARN, l'ADN, les protéines et les lipides par les procédés consignés pages 9 et suivantes.

TABLEAU XXVII

Composition relative en ADN, ARN, protéines et lipides du noyau entier

Protéines	100
Lipides	45
ADN	40
ARN	3

C. EXTRACTION DE L'HISTONE TOTALE

Tandis que pour l'étude des propriétés chimiques et physico-chimiques des histones, leur extraction à partir du DPN du tissu total était suffisante, il nous a fallu, en vue de l'étude de leur incorporation d'acides aminés marqués, utiliser des noyaux isolés à partir desquels nous avons extrait les histones, soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire des DPN.

1) Extraction directe avec HCl 0,2 N

A 1 volume de noyaux incubés (4 à 5 mg de protéine totale), on ajoute 4 volumes de HCl 0,2 N. On agite pendant 12 heures à 4°C. On centrifuge pendant 1 heure dans la centrifugeuse International refroidie à 12.000 g. On recueille le surnageant et on le dialyse jusqu'à l'élimination complète des ions Cl^-.

2) Extraction indirecte à partir des désoxyribonucléoprotéides

On agite, pendant 16 heures à 4°C, 3 ml de suspension des noyaux avec une solution de NaCl à 10%. On centrifuge 1 heure à froid à 12.000 g. On recueille le surnageant que l'on dialyse 16 heures contre l'eau distillée. Les désoxyribonucléoprotéides précipitent. A ce précipité, on ajoute 4 volumes de HCl 0,2 N, on agite mécaniquement pendant une nuit, on centrifuge et on dialyse le surnageant jusqu'à élimination des ions Cl^- du dialysat.

D. INCORPORATION DES ACIDES AMINES MARQUES DANS LES NOYAUX

Les noyaux, préparés selon la méthode que nous venons de décrire, sont mis en suspension dans une solution de saccharose 0,145 M et incubés dans le milieu proposé par Allfrey et Mirsky (1957) ou dans le milieu II décrit ci-dessous.

Milieu d'incubation

Milieu I (Allfrey et Mirsky):

-- 0,5 ml de solution tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2 contenant du saccharose 0,25 M .

-- 0,4 ml de solution glucose 0,5 M contenant 3,7 mg/ml de NaCl .

-- 0,25 ou 0,5 µc d'arginine-^{14}C de radioactivité spécifique 510 µc/mg.

-- 1 ml de suspension de noyaux (2 à 3 mg de protéine).

Milieu II :

-- 0,4 ml de tampon Tris 0,025 M pH 7,2 + saccharose 0,1875 M .

-- 0,5 ml glucose 0,05 M, NaCl 0,03 M, $MgCl_2$ 0,005 M.

-- 0,25 ou 0,5 µc d'arginine-^{14}C.

-- 1 ml de suspension de noyaux.

L'incubation est faite à 37° avec agitation pendant 2 heures.

L'incubation témoin est constituée par un tube identique aux autres mais auquel on ajoute, dès le début de l'incubation, 1 ml de solution de TCA à 5%.

Pour mesurer l'incorporation de l'arginine marquée dans les histones, il est indispensable de les décontaminer de toute trace d'acide aminé libre non incorporé et éventuellement adsorbé sur les protéines. Dans ce but, on procède à la décontamination de la manière suivante :

Décontamination :

Après l'incubation, on ajoute dans chaque tube 0,05 ml d'une solution d'albumine à 70 mg/ml comme entraîneur, puis 5 ml de solution de TCA à 5% et on centrifuge pour recueillir le culot de noyaux. La décontamination se fait par deux lavages avec TCA 5%, en mettant le culot en suspension avec beaucoup de soin. Ensuite, on met les noyaux en contact pendant 15 minutes avec 0,25 ml de NaOH N pour détacher l'acide aminé marqué éventuellement adsorbé, ce qui dissout le culot. Les protéines sont précipitées par TCA 5%. On lave trois fois avec TCA 5% et on filtre sur des rondelles de papier filtre, selon la technique mise au point par Zalta (1961), pour obtenir un dépôt homogène de très faible épaisseur et de surface définie. Après séchage, on mesure la radioactivité directement sur le filtre et l'on fait une correction pour tenir compte de l'auto-absorption.

La détermination de la radioactivité se fait à l'aide d'un tube GM, Tracerlab TGC 2 relié à une échelle de comptage Mesco de type RNP 3.

1) Conditions d'incorporation

L'abondance de l'arginine dans les histones et sa caractérisation chimique facile nous a conduite à choisir cet acide aminé dibasique pour étudier l'incorporation des acides aminés. Notre choix s'est trouvé appuyé par les résultats de Crampton (1957), qui a montré que l'histone liée à l'ADN du thymus est une histone riche en arginine.

Les chances d'incorporation d'un acide aminé dans une histone nous semblent d'autant plus grandes que la liaison entre celle-ci et l'ADN est plus étroite et que sa teneur en arginine est plus élevée.

a) Temps d'incubation

Nous avons d'abord fait des incubations assez courtes de noyaux isolés, comme la plupart des auteurs qui étudient les incorporations des acides aminés dans les protéines du noyau. Puis, nous avons prolongé la durée de l'incubation jusqu'à 2 heures et avons constaté que la radioactivité spécifique des protéines augmente avec le temps. Ayant observé qu'après 2 heures l'incorporation est assez importante et que, si l'on prolonge l'incubation au-delà de 2 heures, des contaminations bactériennes faussent les résultats, nous avons adopté pour la plupart de nos expériences une durée d'incubation de 2 heures. Nous avons en outre contrôlé, par examen microscopique, que nos milieux d'incubation, après ce temps, ne sont pas contaminés par des bactéries.

Le Tableau XXVIII donne quelques résultats d'incorporation en fonction du temps.

TABLEAU XXVIII

Noyaux entiers de placenta humain : incorporation d'arginine-^{14}C en fonction du temps

durée d'incubation	0min	30 min	60 min	90 min	120 min
expérience 1	40	64	154	228	328
expérience 2	35	99	212	288	610

Les résultats sont donnés en R.S.:coups/min / mg protéines
radioactivité de l'arginine ajoutée : 0,25 µc par tube incubé.

b) Action des ions Na^+, K^+

Le Tableau XXIX montre que les ions K^+, non seulement ne peuvent remplacer les ions Na^+, mais qu'au contraire, sur le noyau entier, ils inhibent l'incorporation de l'arginine. Les noyaux de placenta humain se comportent donc, dans ce cas, comme des noyaux de thymus de veau ou de foie de rat. Cette expérience nous prouve, en outre, que les noyaux ne sont pas contaminés par des particules cytoplasmiques, puisque ces dernières ont besoin d'ions K^+ pour incorporer les acides aminés.

TABLEAU XXIX

Incubation des noyaux entiers en présence des ions Na^+ et K^+

témoin	Na^+	K^+
29	200	38

concentration de Na^+ = 0,03 M
concentration de K^+ = 0,03 M
acide aminé marqué = arginine
radioactivité spécifique des protéines des noyaux
coups/min /mg protéines

L'étude de l'action des ions nous a conduit à ajouter des ions Mg^{++} à la concentration de 10^{-2} M, pour empêcher que des particules de désoxyribonucléoprotéides sortent des noyaux, d'après une observation de Szafarz et Sripati (1961) sur les noyaux de l'épithéliome de Guérin.

c) Rôle du glucose

Le Tableau XXX montre que l'addition de glucose 0,05 M augmente le taux d'incorporation

TABLEAU XXX

Action du glucose sur l'incorporation de l'arginine-^{14}C dans les protéines du noyau

	sans glucose	avec glucose (0,05 M)	activation
expérience 1	450	500	11%
expérience 2	69	80	16%
expérience 3	145	180	24%
		moyenne	17% ± 4

Radioactivité spécifique des protéines des noyaux (coups/min./mg prot.)

d) Rôle de l'ATP

La plupart des auteurs qui ont étudié l'incorporation des acides aminés dans les protéines signalent que l'addition d'ATP l'exalte.

Nous avons donc ajouté au milieu d'incubation de l'ATP et nous avons constaté, comme le montre le Tableau XXXI, que cette addition n'augmente pas la radioactivité spécifique des protéines des noyaux. Il semble donc que les noyaux contiennent leur propre système producteur d'énergie nécessaire à l'incorporation (comme le pensent Osawa et coll., 1957 et Allfrey et Mirsky, 1957).

TABLEAU XXXI

Action de l'ATP sur l'incorporation de l'arginine-^{14}C dans les protéines du noyau

	témoin	sans ATP	avec ATP (1 µM)	
expérience 1	54	276	208	-25%
expérience 2	35	280	250	-10%

temps d'incubation : 1 heure

2) Incorporation des acides aminés marqués dans les protéines basiques

Nous avons décrit dans les paragraphes précédents, quelles sont les meilleures conditions pour que les noyaux incorporent des acides aminés dans leurs protéines. Il nous faut montrer quelles sont les protéines qui sont marquées et comment s'est répartie la radioactivité dans les noyaux. C'est pourquoi, après incubation, nous avons tout d'abord cherché à extraire les histones par HCl 0,2 N, soit des noyaux entiers, soit des DNP extraits des noyaux comme nous l'avons décrit page 84 .

La radioactivité des noyaux a été mesurée avant et après l'extraction des DNP par NaCl 10% (Tableau XXXII), et avant et après extraction de la protéine basique par HCl 0,2 N (Tableau XXXIII).

TABLEAU XXXII

Incorporation de l'arginine-^{14}C dans les protéines nucléaires avant et après extraction des noyaux par NaCl 10%

exp.	noyaux non extraits			noyaux extraits		
	radioact. totale c/min	quantité protéines mg	radioact. spécif. c/min/mg	radioact. totale c/min	quantité protéines mg	radioact. spécif. c/min/mg
1	303	1,97	154	210	1,40	150
2	1880	3,1	610	1060	2,2	530
3	1187	2,9	412	775	1,9	417
4	254	6,0	41	164	4,0	39

Conditions d'incubation : voir page 85.

Nous constatons que, dans les deux cas, 50% de la radioactivité totale a été entraînée, mais que 50% également des protéines ont été enlevées. Ces résultats permettraient de conclure que la radioactivité spécifique des protéines extraites par les deux méthodes et celle des protéines non basiques restant dans le noyau sont les mêmes.

TABLEAU XXXIII

Incorporation de l'arginine-^{14}C dans les protéines nucléaires avant et après extraction des noyaux par HCl 0,2 N

exp.	noyaux non extraits			noyaux extraits		
	radioact. totale c/min	quantité protéines mg	radioact. spécif. c/min/mg	radioact. totale c/min	quantité protéines mg	radioact. spécif. c/min/mg
1	592	6,6	80	326	4,4	74
2	271	7,5	36	190	5,25	36
3	180	8	22	122	6,6	19

Conditions d'incubation : voir page 85.

Pensant confirmer ce dernier point et pouvoir conclure au marquage de l'histone, nous avons évaporé sous vide l'extrait chlorhydrique avant dialyse, chromatographié sur papier le résidu avec un mélange phénol/H_2O (72:78) et localisé la radioactivité au moyen d'un passeur de chromatogrammes.

La figure 15 montre que dans l'extrait non dialysé, on décèle un pic radioactif et un pic correspondant à l'excès d'arginine.

Pour savoir si ce pic correspond à l'histone marquée, nous avons repris l' extrait chlorhydrique que nous avons, cette fois-ci, dialysé, puis chromatographié. Sur la figure 16, qui se rapporte au chromatogramme de l'extrait dialysé, on ne constate plus de pic radioactif.

Toute la radioactivité extraite par HCl se trouve donc dans le liquide de dialyse. Il est exclu qu'elle soit due à de l'arginine en excès, car la chromatographie sépare toute l'arginine qui aurait pu être entraînée avec la protéine. La fraction extraite par HCl 0,2 N est donc formée pour la plus grande partie d'histone non dialysable, non radioactive, et d'un

FIGURES 15, 16, 18

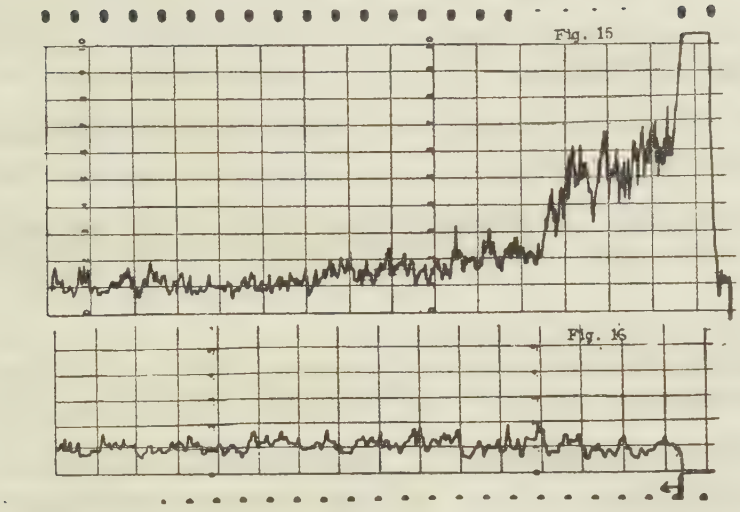


Fig. 15 : Distribution de la radioactivité dans un chromatogramme de l'extrait chlorhydrique non dialysé (solvant : phénol-eau (7:3)).

Fig. 16 : Distribution de la radioactivité dans un chromatogramme de l'extrait chlorhydrique dialysé (solvant : pnéol-eau (7:3)).

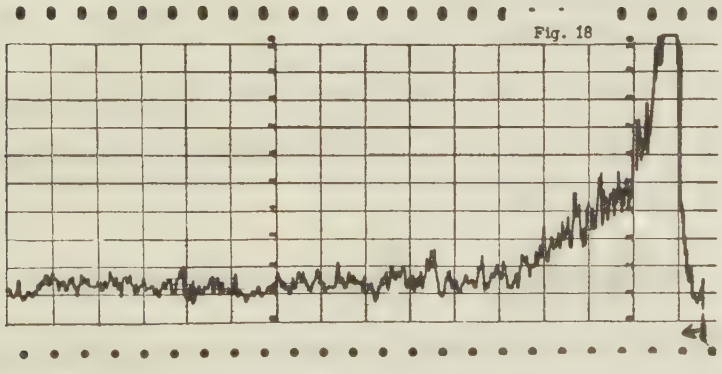


Fig. 18 : Distribution de la radioactivité dans un chromatogramme de l'extrait chlorhydrique non dialysé, après incubation en présence de DFP (solvant : phénol-eau (7:3)).

produit dialysable qui, seul, est radioactif. Donc, la radioactivité spécifique de ce produit dialysable est plus grande que celle des protéines non solubles dans HCl 0,2 N.

On peut représenter ces résultats par le schéma suivant :

radioactivité spécifique des noyaux avant extraction = radioactivité spécifique après extraction

radioactivité spécifique du noyau après extraction = radioactivité spécifique de l'extrait chlorhydrique (1)

$$\text{radioact.spéc.de l'extrait chlorhydr.} = \frac{\text{radioact.totale du produit dialysable}}{\text{produit dialysable + prod.non dialysable}} \quad (2)$$

Donc :

radioactivité spécifique du produit dialysable > radioactivité spécifique de l'extrait chlorhydrique

radioactivité spécifique du produit dialysable > radioactivité spécifique des noyaux résiduels (3)

Le dosage d'azote dans l'extrait chlorhydrique avant et après dialyse montre que 47% de l'azote existent dans cet extrait sous forme dialysable.

Considérons, par exemple, l'expérience n° 2 du Tableau XXXIII. L'égalité (1) ressort des valeurs suivantes :

$$\text{radioactivité spécifique de l'extrait chlorhydrique total} = \frac{271 - 190}{7,5 - 5,25} = 36 \text{ c/min/mg}$$

Donc, les radioactivité spécifiques de l'extrait et des noyaux résiduels sont égales. D'autre part, la radioactivité spécifique de la fraction dialysable se calcule :

$$\frac{271 - 190}{2,25 \times 0,47} - \frac{81}{1,06} = 76 \text{ c/min/mg}$$

L'inégalité (3) est donc vérifiée et l'on voit que la radioactivité spécifique de cette fraction est plus de deux fois supérieure à celle du noyau entier.

3) Etude du composé dialysable extrait par HCl 0,2 N

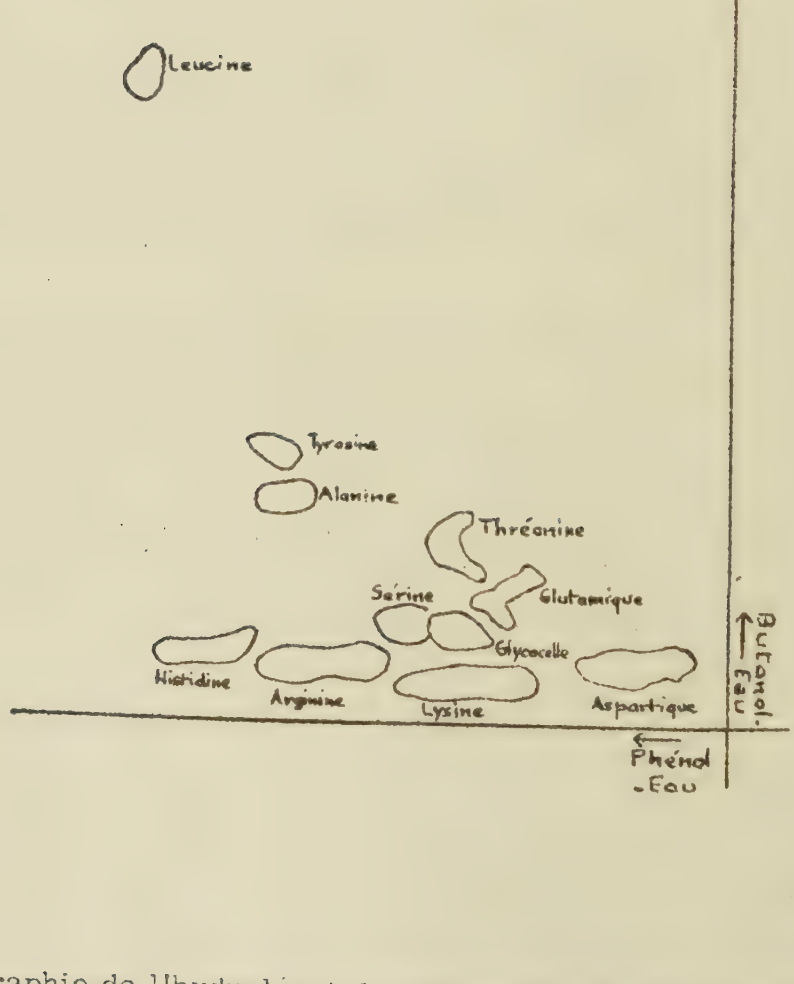
Nous avons découpé la partie radioactive du chromatogramme obtenu avec l'extrait chlorhydrique non dialysé (Fig. 15). Nous avons élué par l'eau, concentré et hydrolysé le résidu d'évaporation par HCl 6 N. Après évaporation de HCl, nous avons fait une chromatographie bi-dimensionnelle avec le solvant butanol-eau-acide acétique (1ère dimension), puis avec le phénol (2ème dimension), c'est-à-dire que nous avons traité la fraction radioactive de l'éluat comme nous aurions traité une protéine.

La Figure 17, qui représente cette chromatographie bi-dimensionnelle, montre que la substance dialysable radioactive est un polypeptide basique, ou une protéine de faible poids moléculaire dialysable, riche en lysine et en arginine, mais contenant aussi des traces d'histidine, d'acides glutamique et aspartique, de leucine et d'alanine. Pour la commodité de la discussion, nous appellerons cette substance : "polypeptide".

Pour pouvoir affirmer que l'histone de l' extrait chlorhydrique n'est pas dialysable, nous avons élué le chromatogramme obtenu avec l'extrait dialysé (Fig. 16) qui, lui, ne présente pas de pics radioactifs. Nous avons constaté, après hydrolyse par HCl 6 N et chromatographie bi-dimensionnelle, comme ci-dessus, que nous avons bien une protéine basique du type histone dans cette fraction non dialysable.

Ces résultats confirment bien qu'après deux heures d'incubation des noyaux isolés avec de l'arginine-^{14}C, la radioactivité se retrouve, non pas dans l'histone totale extraite par l'acide chlorhydrique, mais dans un polypeptide dialysable, présent dans cet extrait, et dont la radioactivité spécifique est supérieure à celle des protéines restant dans les noyaux après extraction.

FIGURE 17



Chromatographie de l'hydrolysat du composé dialysable extrait par HCl 0,
Les conditions expérimentales sont décrites page 93.

Quel rôle peut-on attribuer à ce polypeptide basique dans le métabolisme du noyau et dans celui des histones en particulier ?

On admet généralement que les polypeptides sont des produits de dégradation apparaissant au cours de la protéolyse (Felix, 1921), et l'on pourrait nous objecter que les polypeptides que nous venons de décrire se sont produits par protéolyse de l'histone totale au cours de son extraction. Mais le fait que l'histone totale n'est pas marquée élimine déjà cette objection. D'autre part, quand nous ajoutons l'inhibiteur (DFP) des enzymes protéolytiques, à une concentration de 3×10^{-5}M, à notre milieu d'incubation (Balls et coll., 1953), nous observons toujours l'existence d'un pic radioactif de même R_f que celui du "polypeptide" (Fig. 18, v.page 91).

Ainsi donc, nous pouvons affirmer que le "polypeptide" que nous avons extrait ne provient pas d'une protéolyse de l'histone totale qui se serait faite pendant l'incubation ou au cours de l'extraction.

Quel rôle lui attribuer ? Faut-il le rapprocher des premiers polypeptides extraits par Felix des noyaux de thymus de veau, il y a plus de 30 ans ? A cette époque, on a cru que les polypeptides de Felix étaient des artefacts et on ne leur a attribué aucune importance. Mais depuis les travaux de Northrop (1936), qui ont permis d'isoler du suc pancréatique un polypeptide de poids moléculaire de 6000, on a considéré que la présence de peptides dans différents tissus était possible. Enfin, on sait maintenant que des hormones, comme la vasopressine et l'ocytocine, sont des polypeptides et que leur rôle physiologique est des plus important.

Si l'on admet alors que les "polypeptides" trouvés dans les noyaux de placenta humain ne proviennent pas de la dégradation ou de la protéolyse de l'histone totale, on peut se poser les questions suivantes :

-- 1) Les polypeptides sont-ils des précurseurs de l'histone ?
-- 2) Proviennent-ils d'une synthèse incomplète ou représentent-ils des produits d'accumulation ?
-- 3) Auraient-ils un autre rôle que celui d'être des précurseurs des histones ?

1) Nous devons admettre que, si ces polypeptides étaient les précurseurs directs de l'histone totale, celle-ci devrait, dans les expériences avec des traceurs radioactifs, être marquée; or, elle ne l'est pas. Cette observation peut s'expliquer, soit parce que l'histone totale n'est pas synthétisée in vitro et qu'il y a seulement accumulation des précurseurs, soit parce que le renouvellement ou la synthèse de l'histone sont très lents, et que le temps d'incubation est trop court pour que nous puissions observer une incorporation mesurable.

Ces deux hypothèses sont en accord avec le fait que le placenta, au stade final de la gestation, a une activité mitotique presque nulle, ce qui entraîne évidemment une diminution de l'activité métabolique de l'ADN de l'histone.

L'idée de Butler (1959), selon laquelle l'histone totale résulte de la polymérisation d'une unité de structure relativement simple s'accorde bien avec ces hypothèses. Quant à l'hypothèse de Monty (1959), selon laquelle, pendant la mitose, des polypeptides basiques se forment et participent par polymérisation à la formation de différentes histones de poids moléculaires élevés, elle rejoint l'idée de Butler.

Cependant, nous devons noter que tous ces arguments ne peuvent exclure l'idée que le "polypeptide" n'est pas précurseur de l'histone, puisque celle-ci n'est pas marquée.

2) Il est certain que les conditions in vitro de nos expériences peuvent provoquer un blocage de la synthèse de l'histone ou d'une autre protéine

dont les "polypeptides" seraient éventuellement des précurseurs. Pour trancher cette question, il faudrait pouvoir procéder à des expériences in vivo qui répondraient également à notre première question. Mais étant donné que nous étudions le placenta humain, de telles expériences sont irréalisables. Il faudrait utiliser un autre tissus se prêtant à l'expérimentation in vivo.

3) A la troisième question, nous ne pouvons donner aucune réponse. Néanmoins, il faut remarquer que les "polypeptides basiques" pourraient se lier à une fraction de l'ARN et l'accompagner lors de son passage ultérieur dans le cytoplasme. Ceci rejoindrait l'hypothèse de Caspersson sur le passage de substances basiques des noyaux dans le cytoplasme. A ce propose, notons également l'observation de Cohn (1960) et de T'so (1958) sur l'existence de protéines basiques dans les microsomes de foie de rat et de grains de pois en germination.

En conclusion, nous avons isolé des "polypeptides basiques" dont l'étude approfondie peut contribuer à élucider le rôle physiologique de l'histone. En effet, s'il était prouvé qu'il n'y a pas de relation entre l'histone et les "polypeptides", ce seraient les "polypeptides" et non l'histone qui joueraient un rôle actif en liaison avec l'ADN, ce que nos expériences ne permettent évidemment pas d'affirmer. Au contraire, s'il était démontré que les histones ont effectivement comme précurseurs des "polypeptides basiques", un aspect de leur rôle métabolique serait ainsi mis en évidence.

. NOYAUX ECLATES

Les premières études sur l incorporation des acides aminés dans les protéines nucléaires ont porté sur les fractions obtenues à partir des noyaux éclatés, après incubation en présence d'acides aminés marqués.

Mais les résultats de Zamecnik (1958) et de son école sur l'étude du mécanisme de la synthèse protéique dans le cytoplasme ont amené de nombreux chercheurs, dont nous-même, à étudier si des mécanismes analogues existent dans les noyaux.

C'est pourquoi, on a commencé à fractionner les noyaux et à étudier l'incorporation des acides aminés dans les différentes fractions obtenues.

L'histone totale n'ayant aucune influence sur l'incorporation des acides aminés dans les noyaux intacts, il nous a paru intéressant de voir si sa présence ne modifiait pas le taux d'incorporation dans les protéines des fractions particulaires isolées, au cours d'incubations in vitro. Il est certain que certaines de ces fractions possèdent des mécanismes de synthèse protéique et il se pourrait que l'histone agisse sur sur ces mécanismes. S'il en est ainsi, et nos expériences montrent qu'un effet est réellement observé, la comparaison avec l'effet produit par d'autres protéines basiques telles que les protamines, la RNase et la polylysine, peut nous fournir des renseignements sur la nature de cette action.

1) Obtention de fragments par action d'agents tensio-actifs

Nous avons essayé différents agents tensio-actifs, afin de déterminer lequel d'entre eux conserve le mieux l'activité métabolique des fractions des noyaux éclatés.

Nous avons utilisé les agents tensio-actifs suivants :

-- Lissapol N(arylalkylphénolpolyoxyéthylène (neutre)).
-- Cerulsol (arylalkylphénolpolyoxyéthylène (neutre)).
-- Sinnopon NT(arylalkylsulfonate de triéthanolamine, anionique).
-- L 230 (dodécylsulfate de triéthanolamine, anionique).

L'éclatement de la membrane nucléaire est favorisé par

l'action successive d'un agent tensio-actif neutre du type polyoxyéthylène et d'un agent tensio-actif anionique.

Des expériences préliminaires de Zalta (1961) ayant montré que l'activité de ces agents tensio-actifs est optimale à pH 5, nous avons toujours procédé en milieu tamponné à pH 5 (la solution tampon utilisée est de 0,05 M en acide phosphorique, 0,01 M en acide acétique et amenée à pH 5 avec une solution de Tris molaire .

Nous avons essayé les mélanges suivants :

A) 1 ml de suspension de noyaux en solution de saccharose 0,145 M
1 ml de Lissapol N 2,5 %
1 ml de Sinnopon NT
10 ml de tampon pH 5

B) 1 ml de suspension de noyaux en solution de saccharose 0,145 M
1 ml de Lissapol N
2 ml de L 230
10 ml de tampon pH 5

C) 1 ml de suspension de noyaux en solution de saccharose 0,145 M
1 ml de Cemulsol
1 ml de Sinnopon NT
10 ml de tampon pH 5

D) 1 ml de suspension de noyaux en solution de saccharose 0,145 M
1 ml de Cemulsol
0,2 ml de L 230
10 ml de tampon pH 5

Les suspensions de noyaux dans ces différents milieux ont été soumises au broyage à l'Ultra-Turrax, à 220 volts, pendant 1 minute. L'éclatement des noyaux est contrôlé au microscope à contraste de phase et la suspension centrifugée à différentes vitesses : à 600 g pendant 10

minutes pour éliminer les débris cellulaires et les noyaux non éclatés, puis à 24.000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite centrifugé dans la Spinco préparative à 105.000 g dans le bloc 40 pendant 1 heure.

Les deux culots (24.000 g et 105.000 g, le premier ayant une teneur en protéines 2 à 3 fois plus élevée que le second) ont été dialysés pendant 12 heures contre un tampon phosphate 0,005 M afin d'éliminer les agents tensio-actifs. Après dialyse, les fractions ont été incubées avec de la leucine marquée, en présence de tampon Tris 0,05 M pH 7,4, de NaCl 0,03 M et de $MgCl_2$ 0,005 M. Le Tableau XXXIV rend compte de la capacité d'incorporation des acides aminés des fractions obtenues par l'action des différents agents tensio-actifs. Il montre que les fractions sont plus actives lorsque l'on utilise le mélange A.

TABLEAU XXXIV

Incorporation de la leucine-^{14}C dans les fractions nucléaires obtenues par l'action des agents tensio-actifs indiqués

agent tensio-actif	culot 24.000 g	culot 105.000 g
A	27.600	500
B	3.300	740
C	7.870	700
D	2.480	492

Les résultats sont exprimés en radioactivité spécifique : coups/min/mg de protéines

Conditions d'incubation : voir page 102.

Obtention de différentes fractions à partir des noyaux éclatés

Nous avons toujours utilisé le mélange .A (voir page 99) et nous avons procédé à des fractionnements plus poussés. Après avoir éliminé les débris cellulaires et les noyaux entiers, nous avons soumis le surnageant à une centrifugation fractionnée :

I	1000 g	pendant dix minutes
II	5000 g	pendant dix minutes
III	24000 g	pendant dix minutes
IV	105000 g	pendant une heure.

Nous appellerons les culots de ces centrifugations : fractions I, II, III et IV.

Nous avons effectué les dosages d'ADN, d'ARN et des protéines dans chacune de ces fractions.

2) Etude des fractions

L'éclatement des noyaux permet de séparer par centrifugation des fractions ayant la capacité d'incorporer les acides aminés.

Afin d'étudier l'action des histones sur le processus d'incorporation des acides aminés, il était important de définir ces fractions d'une façon plus précise quant à leur structure, leur composition et l'efficacité avec laquelle elles incorporent les acides aminés.

A cette fin, nous avons procédé à :

a) L'examen microscopique des fractions particulaires

L'examen microscopique à contraste de phase montre que :

-- La fraction I ne contient pas de noyaux intacts, ni de débris de membranes, mais des granulations isolées ou des agrégats granulaires de différentes tailles.

-- La fraction II ne contient ni noyaux, ni débris de membranes, mais

des granulations de dimensions un peu plus homogènes que la fraction I

-- La fraction III ne contient ni noyaux intacts, ni débris de membranes mais des granulations de dimensions un peu plus homogènes que dans la fraction II.

-- La fraction IV est constituée par des granulations hétérogènes

b) l'étude de l'activité d'incorporation des fractions particulaires

Nous avons incubé chacune des quatre fractions particulaires de la façon suivante :

-- 0,2 ml de suspension de fractions particulaires correspondant à 50 -150 µg de protéines

-- 0,05 ml de tampon Tris M pH 7,4

-- 0,1 ml ($MgCl_2$ 0,05 M
(NaCl 0,3 M

-- 5 µl d'une solution de leucine-^{14}C, radioactivité spécifique 600 µc/mg

-- on complète à 1 ml avec de l'eau

Les résultats des incorporations de leucine-^{14}C dans les protéines des quatre fractions étudiées sont rassemblés dans le Tableau XXXV.

TABLEAU XXXV

Incorporation de leucine-^{14}C dans les protéines des fractions nucléaires

Exp.	Fractions I	II	III	IV
1	4.205	2.570	154	216
2	10.400	4.650	379	1860

Les résultats sont exprimés en radioactivité spécifique : c/min/mg protéines
Conditions d'incubation : voir texte

On voit que la fraction III, qui sédimente à 24.000 g, est très peu active. Par contre, les fractions I et II sont les plus actives

tandis que la fraction qui sédimente à 105.000 g (IV) est moins active que les deux premières.

3) Etude de la composition chimique des quatre fractions particulaires

Les dosages d'ARN, d'ADN et des protéines ont donné les résultats suivants : Tableau XXXVI

TABLEAU XXXVI

Teneur en ARN, ADN et protéines des fractions nucléaires

FRACTION	% ARN	% ADN	% Protéines	ADN/ARN
I	1,5	12,5	86	8,3
II	2,0	5,8	92	2,9
III	1,5	30,0	69	20,0
IV	2,5	14,0	83	5,6

La fraction la moins active (III) est celle qui est la plus riche en ADN (30%); la fraction qui sédimente à 105.000 g (IV) contient encore de l'ADN en quantité assez importante (14%), mais elle est la plus riche en ARN. Le fait que ces particules, bien que sédimentant à la même vitesse que les particules microsomiques, contiennent de l'ADN est au moins un argument supplémentaire en faveur de leur origine nucléaire.

4) Effet des histones sur l'incorporation de leucine-^{14}C dans les protéines des fractions nucléaires

La caractérisation des différentes fractions, bien qu'encore incomplète, nous a permis d'établir entre elles des différences suffisamment importantes pour entreprendre l'étude de l'effet des histones sur leurs activités respectives.

TABLEAU XXXVII

Effet de l'histone totale et des fractions A et B sur l'incorporation de la leucine-^{14}C dans les fractions particulaires du noyau

Histone ajoutée	Fraction I rad. spéc.	Fraction I inhib. %	Fraction II rad. spéc.	Fraction II inhib. %	Fraction IV rad. spéc.	Fraction IV inhib. %
Témoin	2645	-	2050	-	633	-
Histone totale	1430	45,9	1170	42,9	362	42,8
Histone A	1690	36,1	1139	45,4	294	53,6
Histone B	1690	36,1	1290	37,1	353	44,2

quantité d'histone ajoutée : 150 µg
Les résultats sont exprimés en radioactivité spécifique : coups/minute /mg de protéines
Conditions d'incubation : voir page 102

On constate (Tableau XXXVII) que l'histone totale, ainsi que ses fractions, inhibent environ à 40% l'incorporation des acides aminés dans les protéines. Si l'on compare ce résultat avec ceux obtenus avec les autres protéines basiques (Tableau XXXVIII), on voit que ces dernières sont, à quantité égale, beaucoup plus actives. Ceci

TABLEAU XXXVIII

Effet de la protamine et de la polylysine sur l'incorporation de la leucine-^{14}C dans les fractions particulaires du noyau.

Protéine ajoutée	Fraction I rad. spéc.	Fraction I inhib. %	Fraction II rad. spéc.	Fraction II inhib. %	Fraction IV rad. spéc.	Fraction IV inhib. %
Témoin	30.890	-	13.900	-	2300 180	-
Protamine	1.260	95,9	600	95,7	420	81,7
Polylysine					49	72,8

quantité de protamine et de polylysine ajoutée : 150 µg
Les résultats sont exprimés en radioactivité spécifique : coups/minute /mg de protéines
Conditions d'incubation : voir page 102

peut s'expliquer par leur composition en acides aminés basiques, en particulier l'arginine. La basicité plus forte pour la protamine (25% d'arginine) que pour l'histone (12% d'arginine), serait ainsi déterminante quant à l'action inhibitrice que nous observons. Cette interprétation est valable pour les fractions A et B de l'histone (Tableau XXXVII).

Ainsi, les protéines basiques, d'une façon générale, inhibent l'incorporation dans toutes les fractions. Cette inhibition pourrait s'expliquer par la formation d'un complexe entre ces protéines et les acides nucléiques contenus dans ces fractions. Il était donc intéressant de connaître le rôle éventuel de l'ADN ou de l'ARN dans le processus d'incorporation.

Nous avons donc recherché si l'effet de la ribonucléase et de la désoxyribonucléase se traduit par une inhibition.

5) Effet de la désoxyribonucléase

La désoxyribonucléase (Sigma) a été ajoutée à raison de 1 mg/ml au milieu d'incubation. Les résultats sont consignés dans le Tableau XXXIX.

TABLEAU XXXIX

Effet de la désoxyribonucléase et de la ribonucléase sur l'incorporation de la leucine-^{14}C dans les fractions particulaires du noyau

Nucléase ajoutée	Fraction I R.S.	Act.%	Fraction II R.S.	Act.%	Fraction III R.S.	Act.%	Fraction IV R.S. 1	2	3	Act.% 1	2	3
Témoin	9230	-	6855	-	4400	-	3600	2180	575			
DNase	7200	-22,0	5070	-26,0	5360	+21,8	3580	-	-	0		
RNase	10150	+10,0	8030	+17,1	6525	+48,3	2870	1910	368	-20,3	-12,4	-36

quantité de désoxyribonucléase ajoutée : 1 mg par incubation
quantité de ribonucléase ajoutée : 150 µg par incubation
Les résultats sont exprimés en radioactivité spécifique: coups/minute / mg de protéines

Conditions d'incubation : voir page 102
R.S. = radioactivité spécifique
Act. = activation

On constate que la désoxyribonucléase inhibe l'incorporation de la leucine-^{14}C dans les fractions I et II qui sont aussi les plus pauvres en ADN. La fraction IV n'est pas affectée par la désoxyribonucléase, tandis que la fraction III est trop irrégulière pour tirer des conclusions valables des résultats qui la concernent.

6) Effet de la ribonucléase

La ribonucléase pancréatique a été ajoutée à raison de 150 µg/ml au milieu d'incubation. Les résultats (Tableau XXXIX) montrent que la ribonucléase a pour effet d'exalter l'incorporation des acides aminés dans les fractions I, II et III, tandis qu'elle l'inhibe pour la fraction IV.

Ce résultat est assez surprenant si l'on songe au rôle prêté à l'ARN dans l'incorporation des acides aminés. Des résultats analogues ont été trouvés par Zalta (1961) sur l'action de la ribonucléase sur l'incorporation des acides aminés dans les particules ribosomiques.

L'action de la ribonucléase, du moins en ce qui concerne les fractions I, II et III, ne peut pas s'expliquer par la basicité de cette protéine, puisque les protéines basiques ont un effet inhibiteur marqué dans toutes les fractions, ce qui avait déjà été établi par d'autres auteurs (Kauffmann et coll., 1955; Allfrey et coll., 1958)

F. CONCLUSION

L'ensemble des résultats concernant l'incorporation des acides aminés dans les fractions particulaires I à IV est reporté dans le Tableau XL. (voir page suivante).

TABLEAU XL

Effet des différentes protéines sur l'incorporation de la leucine-^{14}C dans les protéines des fractions particulaires

Fraction	I	II	III	IV
Effet de				
DNase	inhibition	inhibition		nul
RNase	exaltation	exaltation	comportement très irrégulier	inhibition
histone totale	inhibition	inhibition		inhibition
protamine	(très forte (inhibition	(très forte (inhibition		(très forte (inhibition
fraction A	inhibition	inhibition		inhibition
fraction B	inhibition	inhibition		inhibition
polylysine				(très forte (inhibition

Les histones ont donc un effet inhibiteur net sur l'incorporation in vitro des acides aminés dans les différentes fractions nucléaires.

Il nous semble douteux que cet effet résulte de l'activité nucléasique attribuée par certains auteurs (Leslie, 1961) à ces protéines. En effet, l'inhibition n'est pas liée aux propriétés nucléasiques de ces protéines : la ribonucléase elle-même, loin d'inhiber l'incorporation, l'exalte au contraire, dans les fraction I, II et III.

D'autre part, si l'inhibition était liée à l'activité nucléasique, elle devrait présenter une certaine spécificité de substrat. Or l'histone totale, aussi bien que ses fractions, la protamine et la polylysine, inhibent l'incorporation des acides aminés dans toutes les fractions nucléaires, qu'elles soient sensibles à la RNase ou à la DNase.

Les histones, par leurs groupes basiques, et les acides nucléiques, par leurs fonctions acides, peuvent former des complexes (Frenster, 1961), ce qui pourrait rendre compte de l'inhibition de l'incorporation. Ceci expliquerait que les propriétés inhibitrices existent aussi

pour d'autres protéines basiques (protamine, polylysine) et surtout que plus ces protéines sont basiques, plus leur activité inhibitrice est grande.

Dans le cas de la protamine, l'inhibition est complète; dans le cas de l'histone, elle est partielle. Il semble donc que in vitro, l'histone se combine aux acides nucléiques en bloquant certains sites seulement. Cette inhibition partielle de l'incorporation des acides aminés se retrouverait peut-être in vivo et dans ce cas, elle jouerait sans doute un rôle dans le mécanisme de synthèse des protéines nucléaires.

oooooooo

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons entrepris ce travail dans le but de rechercher une spécificité de tissu ou d'espèce et mettre éventuellement en évidence un rôle métabolique de l'histone du placenta humain.

Les recherches sur les histones faites jusqu'à présent n'ont fourni que des résultats difficilement comparables entre eux, car, trop souvent, différentes propriétés ont été mises en évidence du fait de méthodes de préparation différentes. Aussi avons-nous adopté pour la présente étude une méthode de préparation définie, à savoir l'extraction de l'histone par HCl 0,2 N à partir de désoxyribonucléoprotéides, et effectué sur cette préparation toutes les analyses de propriétés chimiques et physico-chimiques. Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de présenter les conclusions suivantes :

L'histone totale, de point isoélectrique 10,9, se caractérise par sa richesse en lysine et une teneur en acides aminés basiques de 25%. Quant à ses groupes N-terminaux, ils sont constitués par la proline et l'alanine en plus grand pourcentage. Les analyses physico-chimiques montrent :

- a) à l'électrophorèse, que l'histone est composée de plusieurs fractions en équilibre qui s'associent et se dissocient en fonction du pH ;
- b) à l'ultracentrifugation, que l'histone totale semble moins hétérogène qu'à l'électrophorèse, car seulement deux constituants sont mis en évidence; néanmoins, cette technique confirme aussi que les variations de pH provoquent l'apparition de produits d'association réversible.

Ayant ainsi démontré l'hétérogénéité de l'histone totale,

nous en avons étudié les fractions obtenues par deux méthodes différentes. Les fractions se distinguent l'une de l'autre par leur teneur en lysine et arginine; chacune d'elles est hétérogène.

Une des fractions est combinée à des lipides et ses acides aminés N-terminaux sont différents de ceux trouvés dans les autres fractions. Une autre fraction présente une teneur en acides aminés basiques inférieure à celle de 25%, caractéristique des histones.

Les propriétés physico-chimiques des fractions sont semblables à celles de l'histone totale, sauf en ce qui concerne ces deux mêmes fractions. La première s'associe et se dissocie toujours irréversiblement; la deuxième s'associe et se dissocie réversiblement ou non, suivant les conditions expérimentales.

Nos analyses et la comparaison des résultats obtenus avec ceux de travaux similaires ne permettent pas de tirer de conclusions certaines au sujet d'une spécificité de tissu ou d'espèce pour l'histone de placenta humain.

Quant aux histones, elles semblent métaboliquement peu actives, l'incorporation des acides aminés y étant pratiquement nulle. Mais elles sont accompagnées d'un "polypeptide" basique à renouvellement important qui pourrait servir de précurseur soit aux histones, soit à d'autres protéines nucléaires. Nos résultats ne semblent pas confirmer la première de ces hypothèses.

Enfin, nous avons montré que l'histone exerce une action inhibitrice partielle sur l'incorporation des acides aminés dans les diverses particules nucléaires. Elle jouerait peut-être un rôle régulateur dans le métabolisme nucléaire en formant des complexes avec les acides nucléiques.

°°°°°°°°°

BIBLIOGRAPHIE

ALFERT M., GESCHWIND I.I., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. (1953) 39, 991.

ALLFREY V.G., DALY M.M., MIRSKY A.E., J.Gen.Physiol. (1953) 37, 157

ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., OSAWA S., J.Gen.Physiol. (1957a) 40, 451.

ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. (1957b), 43, 589.

ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., The Chemical Basis of Heredity (W.D.McElroy and B.Glass Eds.) John Hopkins Press, Baltimore (1957c), p.200.

ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. (1958a), 44, 981

ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., Trans.N.Y.Acad.Sci., Ser.II (1958 b) 21, 3

BAKAY B., KIRCHNER L., TONNIES G., Biochim.Biophys.Acta (1957) 24, 329.

BALLS A.K., JANSEN E.F., Adv.in Enzymol. (1953) 13, 331.

BEHRENS M., Z.Physiol.Chem.(1932) 209, 59.

BERGMANN H., J.Biol.Chem. (1937) 119, 35

BERGMANN H., FRUTON J.S., Ann.N.Y.Acad.Sci. (1944) 45, 409.

BIJVOET P., Biochim.Biophys.Acta (1957) 25, 502.

BISERTE G., HOLLEMAN J.V., HOLLEMAN-DEHOVE J., SAUTIERE P. J.Chromatography (1959) 2, 225.

BRACHET J., Arch.Biol. (1941) 53, 207.

BRACHET J., Biochim.Biophys.Acta (1955) 18, 247.

BRACHET J., Exposés de Biochimie Médicale (1958) 20e série, 181.

BUSCH H., DAVIS J.R., ANDERSON D.C., Cancer Res. (1958a) 18, 910.

BUSCH H., DAVIS J.R., Cancer Res. (1958b) 18, 1241.

BUSCH H., Seventh Intern.Cancer Congress, London (1958c) Acta 16

BUTLER J.A.V., DAVISON P.F., JAMES D.W.F., SHOOTER K.V., Biochim.Biophys.Acta (1954) 13, 224.

BUTLER J.A.V., Exposés de Biochimie Médicale (1959) 21e série, 41

CASPERSSON T., Naturwiss. (1941) 28, 33.

CASPERSSON T., The Relation between Nucleic Acid and Protein Synthesis, Symp.Soc.Exp.Biol.(1947) 1, 127.

CASPERSSON T., Cell Growth and Cell Function (1950) Norton, N.Y.

CHAUVEAU J., MOULE Y., ROUILLER Ch., Exp.Cell Res. (1956) 11, 317.

COHN P., SIMSON P., BUTLER J.A.V., Biochem.J. (1960) 76, 23.

COLOBERT L., DE MENDE S., J.Chim.Phys. (1956) 206.

CRAMPTON C.F., MOORE S., STEIN W.H., J.Biol.Chem. (1955) 215, 787.

CRAMPTON C.F., J.Biol.Chem. (1957) 227, 495.

CRUFT H.J., MAURITZEN C.M., STEDMAN E., Nature (1954) 174, 580.

CRUFT H.J., HINDLEY J., MAURITZEN C.M., STEDMAN E., Nature (1957) 180, 1107.

CRUFT H.J, MAURITZEN C.M., STEDMAN E., Phil.Trans.Roy.Soc. (1957b) B 241, 93.

DALLAM R.D., THOMAS L.E., Biochim.Biophys.Acta (1953) 11, 79.

DALLAM R.D., Arch.Biochem.Biophys. (1955) 54, 24.

DALY M.M., MIRSKY A.E., RIS H., J.Gen.Physiol. (1950-51) 34, 439.

DALY M.M., ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., J.Gen.Physiol. (1952) 36, 173

DALY M.M., MIRSKY A.E., J.Gen.Physiol. (1955) 38, 405.

DAVISON P.F., JAMES D.W.F., SHOOTER K.V., BUTLER J.A.V., Biochim.Biophys.Acta (1954a) 15, 415.

DAVISON P.F., BUTLER J.A.V., Biochim.Biophys.Acta (1954b) 15, 439.

DAVISON P.F., Biochem.J. (1957a) 66, 703.

DAVISON P.F., Biochem.J. (1957b) 66, 708.

DELSAL J.L., MANHOURI H., Bull.Soc.Chim.Biol. (1958) 11, 1623

DE MENDE S., KLYSZEJKO L., KHOUVINE Y., Bull.Soc.Chim.Biol., (1960) 42, 775.

DOUNCE A.L., Ann.N.Y.Acad.Sci. (1950) 50, 982.

DURRUM E.L., J.Am.Chem.Soc. (1950) 72, 2943.

ENGBRING V.K., LASKOWSKI M., Biochim.Biophys.Acta (1953) 11, 244

FELIX K., Z.Physik.Chem. (1921) 116, 150.

FICQ A., ERRERA M., Arch.Intern.Physiol. (1956) 64, 533.

FISCHL ., J.Biol.Chem. (1960) 235, 999.

FRENSTER J.H., ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., Biochim.Biophys. Acta (1961) 47, 130.

FURTH J.J., HURWITZ J., GOLDMAN M., Biochem.Biophys.Res. Comm. (1961) 4, 362.

GILBERT G.A., JENKINS R.C.L., Nature (1956) 177, 853 .

GREGOIRE J., GREGOIRE J., REYNAUD J., Comptes Rendus (1953) 236, 1922.

GREGOIRE J., LIMOZIN M., Bull.Soc.Chim.Biol. (1954) 36, 15.

HAMER D., Brit.J.Cancer (1951) 5, 130.

HIRSCHBEIN L., KHOUVINE Y. ., Comptes Rendus (1957) 244, 517.

HIRSCHBEIN L., DE MENDE S., KHOUVINE Y., Comptes Rendus (1959) 248 , 870.

HIRSCHBEIN L., ROZENCWAJG R., Comptes Rendus (1960) 251, 1309.

HOAGLAND M.B., Nucleic Acids (Chargaff E. and Davidson J.N., Eds.) Acad.Press Inc., New-York-London (1960) chap.37, vol.III.

HOGEBOOM G.H., SCHNEIDER W.C., J.Biol.Chem. (1952) 197, 611.

HOUGET J., BOUTOU G., Bull.Soc.Chim.Biol. (1958) 40, 1663,

HURWITZ J., BRESLER A., DIRINGER R., Biochem.Biophys.Res. Comm. (1960) 3 , 15.

JEENER R., SZAFARZ D., Arch.Biochem.Biophys. (1950) 26, 54.

JOHNSON P., SHOOTER M.E., J.Colloid.Sci. (1948) 3, 539.

KAUFFMANN S.P., DAS N.K., Chromosoma (1955) 7, 19.

KAWADE Y., Biochim.Biophys.Acta (1957) 26, 61.

KHOUVINE Y., GREGOIRE J., Comptes Rendus (1950) 231, 1100.

KHOUVINE Y., GREGOIRE J., ZALTA J.P., Bull.Soc.Chim.Biol. (1955) 35, 244.

KLYSZEJKO L., KHOUVINE Y., Bull.Soc.Chim.Biol. (1960) 42, 761.

KNOBLOCH A., MATSUDAIRA H., VENDRELY R., Comptes Rendus (1957) 244, 2980.

KOSSEL A., KUTSCHER F., Z.Physiol.Chem. (1900) 31, 165.

KOSSEL A., The Protamines and Histones, London, Longmans Green and Co. (1928).

LESLIE I., Nature (1961) 189, 260.

LONGSWORTH J.G., McINES D.A., J.Am.Chem.Soc. (1940) 62, 705.

LONGSWORTH J.G., McINES D.A., J.Gen.Physiol. (1942) 25, 507.

LOWRY O.M., ROSENBROUGH N.S., FARR A.L., RANDALL R.S., J.Biol.Chem. (1951) 193, 265.

LUBOCHINSKY B., ZALTA J.P., Bull.Soc.Chim.Biol. (1954) 36, 1363.

LUCK J.M., COOK H.K., ELDREDGE N.T., HALEY M.I., KUPKE D.W. RASMUSSEN P.S., Arch.Biochem.Biophys. (1956) 65, 449.

LUCK J.M., STRØIER P., SATAKE K., TSVEITIKOV A.N., J.Biol.Chem. (1958) 233, 1407.

LUZZATI V., NICOLAIEFF A., J.Mol.Biol. (1959) 1, 127.

LUZZATI V., NICOLAIEFF A., Comptes Rendus (1959) 248, 1426.

MARSHAK A., CALVELT F., J.Cell. Comp..Physiol. (1949) 34, 451.

MAYER D.T., GULIK A., J.Biol.Chem. (1942) 146, 433.

MAZIA D., DAN K., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. (1952) 38, 826.

MIESCHER F., Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten Vogel. Leipzig (1897).

MIRSKY A.E., POLLISTER A.W., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. (1942) 28, 344.

MIRSKY A.E., POLLISTER A.W., J.Gen.Physiol. (1946) 30, 117.

MONTY K.J., DOUNCE A., J.Cellular Comp.Physiol. (1959) 53, 377.

MOULE Y., CHAUVEAU J., Exp.Cell.Res. (1959) supplt. 7, 156.

NELSON L., Arch.Exp.Pathol.Pharmakol. (1908) 59, 336.

NORTHROP S.H., J.Gen.Physiol. (1936) 19, 991.

OCHOA S., BURMA D.P., KRÖGER H., WEILL J.D., Fed.Proc. (1961) 20, 362.

OSAWA S., ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., J.Gen.Physiol. (1957) 40, 491.

PETERSON E.A., SOBER H.A., J.Am.Chem.Soc. (1956) 78, 751.

PHILLIPS D.M.P., Biochem.J. (1958) 68, 35.

PHILLIPS D.M.P., JOHNS E.W., Biochem.J. (1959a) 71, 71p.

PHILLIPS D.M.P., JOHNS E.W., Biochem.J. (1959b) 72, 538.

ROTHERHAM J., IRVIN J.I., IRVIN E.M., HOLBROOK D.J., Proc. Soc.Exptl.Biol.Med. (1957) 96, 21.

SANGER F., Biochem.J. (1945) 39, 507.

SLATER T.F., Biochim.Biophys.Acta (1958) 27, 201.

SMELLIE R.M.S., McINDOE W.M., DAVIDSON J.N., Biochim.Biophys. Acta (1953) 11, 559.

SMILLIE L.B., BUTLER G.C., SMITH D.B., Can.J.Biochem.Physiol. (1958) 36, 1.

SRIPATI C.E.S. (communication personnelle).

STEDMAN E., STEDMAN E., Nature (1944) 153, 500.

STEDMAN E., STEDMAN E., Phil.Trans.Roy.Soc. (1951) B 235, 565.

SWAHN B., Scand.J.Chem.Lab.Invest. (1952) 4, 98.

SZAFARZ D. (communication personnelle).

TONNELAT J., Bull.Soc.Chim.Biol. (1954) 1, 43.

T'SO P.O.P., BONNER T., DINTZIS H., Arch.Biochem.Biophys. (1958) 76, 225.

UI N., Biochim.Biophys.Acta (1956) 22, 205.

UI N., Biochim.Biophys.Acta (1957a) 25, 493.

UI N., Bull.Chem.Soc.Japan (1957b) 30, 801.

WANG T., KIRKHAM W.R., DALLAM R.D., MAYER D.T., THOMAS L.E., Nature (1950) 165, 974.

WANG T., MAYER D.R., THOMAS L.E., Exp.Cell Res. (1953) 4, 102.

WEBB J.M., LEVY H.B., J.Biol.Chem. (1955) 213, 107.

WEISS S.B., Fed.Proc. (1961) 20, 362.

WILKINS M.H.F., ZUBAY G., WILSON H.R., J.Mol.Biol. (1959a) 1, 179.

WILKINS M.H.F., ZUBAY G., J.Biophys.Biochim.Cytol. (1959b) 5, 55.

ZALTA J.P., Thèse de Doctorat (Paris) (1961).

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

MÉCANISME DE REPLICATION DE L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE

Vu et approuvé :
Paris, le 6 Mars 1962
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
M. ZAMANSKY

Vu
et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
J. ROCHE